

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/IT05/000078

International filing date: 16 February 2005 (16.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT

Number: RM2004A000105

Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 29 March 2005 (29.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

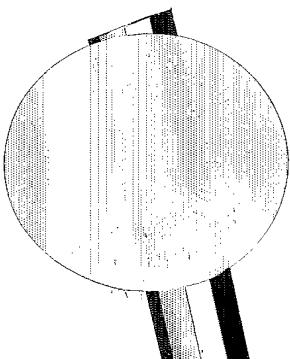
**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2004 A 000105.**

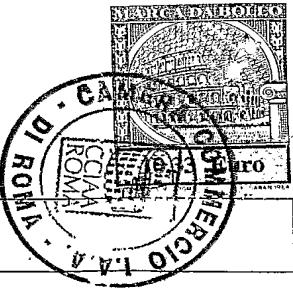
Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

ROMA li..... 15 DIC. 2004

IL FUNZIONARIO

..... Giampietro Carlotto
Giampietro Carlotto





A. RICHIEDENTE/I

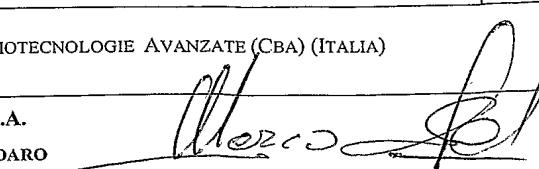
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	TECNOGEN S.C.P.A.			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	08171360582
INDIRIZZO COMPLETO	A4	LOCALITÀ LA FAGIANERIA - 81013- PIANA DI MONTE VERA (CASERTA)			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1				
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4				
A. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1				
INDIRIZZO	B2				
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B3				
C. TITOLO	C1	"ANTICORPO MONOCLONALE ANTITENASCINA UMANA"			

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	DE SANTIS, RITA			
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA			
COGNOME E NOME	D1	PELLICCIA, ANGELA			
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA			
COGNOME E NOME	D1	PALOMBO, GIOVANNA			
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA			
COGNOME E NOME	D1	CARMINATI, PAOLO			
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA			



E. CLASSE PROPOSTA	SEZIONE		CLASSE		SOTTOCLASSE		GRUPPO		SOTTOGRUPPO	
	E1		E2		E3		E4		E5	

F. PRIORITA'		DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO								
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1					TIPO	F2			
	F3						F4			
NUMERO DI DOMANDA	F1					DATA DEPOSITO	F2			
	F3						F4			
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1					TIPO	F2			
	F3						F4			
NUMERO DI DOMANDA						DATA DEPOSITO				
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI	G1	CENTRO DI BIOTECNOLOGIE AVANZATE (CBA) (ITALIA)								
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	TECNOGEN S.C.P.A. P.I. DI MARCO SPADARO									

IL MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO I CLINI LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO PREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	521 BM SPADARO MARCO
	I2	STUDIO ASSOCIATO CAVATTONI-RAIMONDI
DENOMINAZIONE STUDIO	I3	VIALE DEI PARIOLI, 160
INDIRIZZO	I4	00197 ROMA RM
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	L1	RISERVA DI LETTERA DI INCARICO
L. ANNOTAZIONI SPECIALI		

M DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	2		45
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)	2		21
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE ALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			
LETTERA D'INCARICO	SI		
PROCURA GENERALE	NO		
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO		
ATTESTATI DI VERSAMENTO	(LIRE/EURO)	IMPORTO VERSAMENTO	
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	EURO	QUATTROCENTOSETTANTADUE/56	
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)	A	D	F
DATA DI COMPILAZIONE	SI		
	NO		
		27/02/2004	

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

VERBALE DI DEPOSITO	
NUMERO DI DOMANDA	2004 A 000105
C.C.I.A.A. DI	Roma
IN DATA	27 FEB. 2004
LA PRESENTE DOMANDA CORREDATA DI N.	00
IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME	
FOGLI AGGIUNTIVI PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRARIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE	
IL DEPOSITANTE	L'UFFICIALE ROGANTE
 L'Ufficiale Rogante Vanessa Di Burgo	



PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA: 4 A 000105

DATA DI DEPOSITO: 27 FEB. 2004

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO

TECNOGEN S.c.p.A.
Località La Fagianeria – 81013 – Piana di Monte Verna (CE) – Italia

C. TITOLO

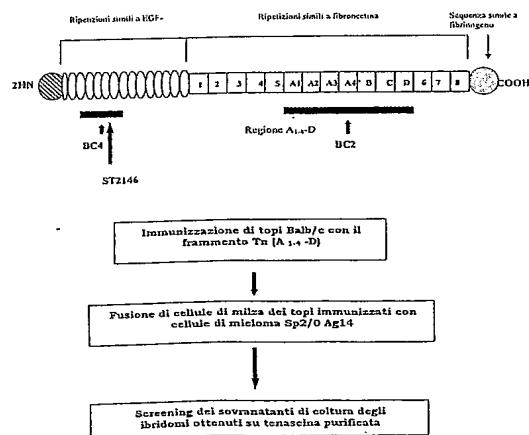
'Anticorpo monoclonale antitenascina umana"

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E. CLASSE PROPOSTA				

CLASSUNTO

E' descritto un anticorpo monoclonale antitenascina umana, le cui regioni variabili delle catene leggera e pesante hanno rispettivamente le sequenze SEQID1 e SEQID2, i suoi frammenti proteolitici capaci di legarsi ad un epitopo antigenico all'interno della regione A1-4-D della tenascina umana, suoi derivati ricombinanti, suoi coniugati e suoi analoghi funzionali similari capaci di legarsi ad un epitopo antigenico all'interno della regione A1-4-D della tenascina umana.

P. DISEGNO PRINCIPALE

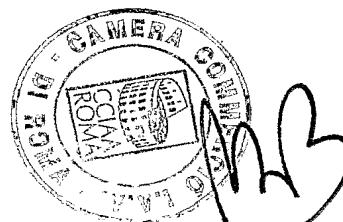


FIRMA DEL/DEI

RICHIEDENTE/I

P.I. DI TECNOGEN S.C.P.A.

DOTT. MARCO SPADARO



Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Anticorpo monoclonale antitenascina umana"

a nome: TECNOGEN S.c.p.A.

di nazionalità: italiana

con sede in: Località La Fagianeria - 81013 -

Piana di Monte Verna (CE)

Inventori: Rita DE SANTIS

Angela PELLICCIA

Giovanna PALOMBO

Paolo CARMINATI

---000---

La presente invenzione riguarda anticorpi monoclonali anti-tenascina umana, i metodi ed i materiali per ottenerli, l'uso di tali anticorpi in metodiche di diagnosi e di trattamento di tumori esprimenti tenascina ed i materiali comprendenti detti anticorpi idonei per l'uso in campo medico.

Campo dell'invenzione

La specificità della terapia tumorale costituisce spesso un fattore limitante nel determinare il successo del trattamento stesso. Infatti la comparsa di effetti tossici e la ridotta tollerabilità di alcuni agenti antitumorali limitano il loro utilizzo e la qualità di vita dei pazienti.

La riduzione della tossicità è direttamente legata alla selettività del trattamento per le sole cellule cancerose. Gli anticorpi monoclonali rappresentano lo strumento ideale per localizzare specificamente il tumore e, se combinati con il sistema di amplifica-

zione avidina/biotina, costituiscono un metodo estremamente potente per indirizzare molecole attive nella sede tumorale.

La tenascina è una molecola della matrice extracellulare, espressa durante l'embriogenesi e nei tessuti adulti durante i processi di cicatrizzazione e sviluppo tumorale, anche a livello dei vasi sanguigni di neoformazione. La tenascina è pressoché assente nei tessuti adulti normali, mentre è espressa nello stroma di molti tumori solidi, come gliomi (*Burdon, et al., Cancer Res., 43:2796-2805, 1983*), carcinomi mammari (*Chiquet-Ehrismann, et al., 1986*), del polmone (*Natali, et al., Intl. J. Cancer, 54:56-68, 1989*), fibrosarcomi e carcinomi di cellule squamose (*Ramos, D.M. et al., Int. J. Cancer, 75:680-687, 1998*). La tenascina è espressa nel glioma, ma non nel corrispondente tessuto cerebrale normale. Per una discussione approfondita sulla tenascina si può fare riferimento a WO 92/04464, Wistar ed alle relative referenze.

Basandosi su EP 0 496 074, G. Paganelli e al. hanno sviluppato un metodo denominato "three-step pretargeting" per il trattamento sistematico e locoregionale dei tumori i cui risultati clinici sono riportati in: *Cremonesi, M., et al., Eur. J. Nucl. Med., 26(2):110-120, 1999*; *Paganelli, G., et al., Eur. J. Nucl. Med., 26(4):348-357, 1999*; *Paganelli, G., et al., Cancer Biother. & Radiopharm., 16(3):227-235, 2001*; *Grana, C., et al., Br. J. Cancer, 86:207-212, 2001*.

Altre referenze per questo tipo di trattamento tumorale sono: WO 94/04702, US 5.578.287.

Il trattamento di "3-step pre-targeting", anche noto con il marchio PAGRIT®, è basato sulla somministrazione sequenziale endovenosa di un anticorpo monoclonale antitenascina biotinilato, streptavidina e ⁹⁰Y-biotina, con somministrazioni di avidina ed albumina biotinilata prima della streptavidina e della ⁹⁰Y-biotina rispettivamente (stadio "chase"), per ridurre i livelli circolanti dell'anticorpo e della streptavidina. La selettività del metodo di "3-step pre-targeting" è dovuta all'uso dell'anticorpo monoclonale antitenascina. Il "targeting" di molecole di matrice extracellulare ha il vantaggio, rispetto a quello rivolto ad antigeni della superficie cellulare, di non essere influenzato dalla modulazione dell'espressione dell'antigene da parte della cellula tumorale stessa. Le dosi, i tempi di somministrazione ed i "chases" del trattamento di "pre-targeting" sono stati stabiliti allo scopo di ottenere i rapporti ottimali di biodistribuzione tumore/non tumore.

I risultati ottenuti su 48 pazienti affetti da glioblastoma (GBM) o da astrocitoma anaplastico (AA), inclusi in uno studio di Paganelli (*Paganelli, G., et al., Eur. J. Nucl. Med., 26(4):348-357, 1999*), hanno dimostrato una sostanziale assenza di tossicità, eccetto alcuni casi di reazione allergica alla streptavidina, e una preliminare efficacia del trattamento. Infatti, 2 mesi dopo la fine del trattamento, il 25% dei pazienti mostrava una riduzione della massa tumorale (CR=6%, PR=11%, MR=8%), ed il 52% dei pazienti rimaneva stabile, con una risposta globale del 77%. In alcuni di

questi pazienti, la cui aspettativa di vita era inferiore a sei mesi, la risposta al trattamento persisteva per più di un anno.

Il ruolo dell'anticorpo biotinilato antitenascina è di localizzarsi nel tumore e mediare, attraverso le molecole di biotina, l'accumulo di avidina e successivamente di ⁹⁰Y-Biotina, indirizzando i radioisotopi direttamente all'interno del tumore. Anticorpi antitenascina sono già oggetto di brevetti e domande di brevetto: US 5,624,659, Duke University; JP 2219590, Rikagaku; WO 92/04464, Wistar; WO 03/072608, Sigma-Tau.



Un particolare anticorpo antitenascina è descritto in: *Siri, A., et al., Nucl. Acid Res., 19(3):525-531, 1991; Balza, E., et al, FEBS 332:39-43, 1993*; ed il suo uso per fini terapeutici è descritto in: *Riva, P., et al., Acta Oncol. 38(3): 351-9, 1999; Riva, P., et al, Cancer, 80 (12): 2733-42; 1997; Riva, P., et al., Int. J. Cancer, 5: 7-13, 1992*.

Il clone usato per la generazione di tale anticorpo negli studi citati è denominato BC-2. La richiedente ha dimostrato che il clone BC-2 non è idoneo allo sviluppo industriale in quanto produce una catena leggera aggiuntiva non funzionale (probabilmente derivante dalla linea parentale di mieloma) il cui livello di espressione aumenta durante lo sviluppo su larga scala del processo produttivo, impedendo la purificazione dell'anticorpo su scala industriale.

È quindi sentita l'esigenza di un anticorpo monoclonale antitenascina che possa essere prodotto su scala industriale ai livelli di purezza richiesti dall'uso farmaceutico.

La precedente domanda di brevetto WO 03/072608, a nome Sigma Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A., descrive la generazione dell'anticorpo antitenascina ST2146, privo della catena leggera aggiuntiva non funzionale, capace di riconoscere un epitopo antigenico condiviso con l'anticorpo BC4, anch'esso contaminato da una catena leggera non funzionale.

L'anticorpo ST2485 oggetto dalla presente invenzione riconosce un epitopo parzialmente condiviso con quello del BC2 quindi localizzato nella stessa regione proteica. Questa regione è altamente espressa in vari tessuti tumorali. Quindi è rilevante disporre di un anticorpo monoclonale omogeneo, specifico per questa regione, da utilizzare per la diagnostica o il targeting tumorale.

Inoltre, la presente invenzione dimostra che l'anticorpo ST2485 presenta il vantaggio di legarsi alla tenascina in aggiunta all'anticorpo ST2146, risultando quindi utile in metodi di pretargeting che prevedano l'uso combinato dei due anticorpi.

Sommario dell'invenzione

È stato ora trovato un anticorpo monoclonale antitenascina umana che risolve i problemi sopra menzionati, poiché non possiede una catena leggera non funzionale e presenta il vantaggio dell'additività quando usato in combinazione con un altro anticorpo antitenascina. Tale anticorpo è oggetto della presente invenzione, insieme al metodo per ottenerlo ed al suo uso in terapia, in particolare per la preparazione di un prodotto utile al trattamento di

malattie caratterizzate dall'espressione di tenascina, come ad esempio i tumori.

La presente invenzione si riferisce all'anticorpo e a frammenti di anticorpo, eventualmente contenenti marcatori ed agenti diagnostici aggiuntivi, ai procedimenti per ottenere tale anticorpo e frammenti di anticorpo, alle composizioni farmaceutiche comprendenti tale anticorpo e suoi frammenti e ai metodi diagnostici e terapeutici che ne fanno uso, nonchè i kit utili per l'attuazione di detti metodi.

La presente invenzione si riferisce inoltre al DNA codificante tale anticorpo o frammenti di esso, ai vettori contenenti tale DNA, alle cellule ospite contenenti tali vettori, alla proteina codificata dalle sequenze nucleotidiche SEQID 1 e SEQID 2, al DNA codificante la proteina ed i frammenti, alle specifiche CDR e proteine contenenti tali CDR. In particolare, la presente invenzione ha per oggetto anche l'ibridoma che produce detto anticorpo monoclonale.

L'anticorpo oggetto della presente invenzione è caratterizzato dalle sequenze della regione variabile delle catene leggera e pesante SEQID 1 e SEQID 2 rispettivamente, riportate nelle figure 17 e 18. Per brevità l'anticorpo oggetto della presente invenzione sarà identificato con il nome ST2485. Anche frammenti di ST2485 o suoi derivati chimici o ricombinanti potranno essere prodotti ed usati nell'ambito della presente invenzione. Sono oggetto della presente invenzione anche i frammenti proteolitici di detto anticorpo capaci di legarsi ad un epitopo antigenico all'interno della

regione A1-4-D della tenascina umana. Nel corso della descrizione della presente invenzione si intenderanno per frammenti di anticorpo quei frammenti in grado di legarsi ad un epitopo antigenico all'interno della regione A1-4-D della tenascina C umana.

Secondo la presente invenzione tale anticorpo o frammenti proteolitici sono di preferenza biotinilati.

Altro oggetto della presente invenzione è costituito dalla linea cellulare di ibridoma, denominata cST2485, producente l'anticorpo ST2485.

La linea cellulare di ibridoma è stata depositata presso il Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rossana Benzi 10, Genova, Italia il 12 Novembre 2003 secondo il Trattato di Budapest, deposito numero PD03003.

Oggetto della presente invenzione sono inoltre i derivati ricombinanti dell'anticorpo ST2485, che possono eventualmente essere biotinilati. In particolare, i derivati ricombinanti sono di preferenza quelli in cui la regione costante murina è sostituita dalla controparte umana (*Ferrer, C., et al., J. Biotechnol., 52: 51-60, 1996*), o quelli in cui la regione costante murina è sostituita da una componente biologicamente attiva, come, per esempio, un membro della famiglia delle avidine (*Penichet ML., et al., J. Immunol., 163: 4421-4426, 1999*), un fattore di crescita utile per la stimolazione di effettori immunologici diretti contro il tumore (per esempio G-CSF, GM-CSF), o quelli in cui la regione costante murina è sostituita da una componente farmacologicamente attiva, come ad esempio un

superantigene, una tossina, una citochina o qualunque altra proteina utile a potenziare la efficacia terapeutica antitumorale (Di Massimo, AM, et al., *British J. Cancer*, 75(6):822-828, 1997; Paren-te D., et al., *Anticancer Research*, 17(6A):4073-4074, 1997). I metodi per ottenere tali derivati ricombinanti sono noti all'esperto del settore.

Altro oggetto della presente invenzione è costituito dai derivati coniugati dell'anticorpo ST2485, eventualmente biotinilati.

In particolare, i derivati coniugati sono di preferenza quelli in cui la componente biologicamente attiva è legata all'anticorpo per mezzo di sistemi convenzionali. Esempi di composti biologicamente attivi sono i membri della famiglia delle avidine, un fattore di crescita utile per la stimolazione di effettori immunologici diretti contro il tumore (per esempio G-CSF, GM-CSF), o quelli in cui la regione costante murina è sostituita da una componente farmacologicamente attiva, come ad esempio un superantigene, una tossina, una citochina o qualunque altra proteina utile a potenziare la efficacia terapeutica antitumorale, farmaci antitumorali, radioisotopi.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso dell'anticorpo o dei suoi derivati per la preparazione di un prodotto farmaceutico utile in un metodo per la radioimmunoterapia tumorale effettuata preferibilmente secondo il metodo denominato "three-step pretargeting" ("pretargeting" a tre stadi), noto anche con il marchio PAGRIT®, comprendente la somministrazione ad un



soggetto affetto da un tumore esprimente tenascina l'anticorpo ST2485 o frammenti proteolitici di esso, preferibilmente biotinilati.

Derivati ricombinanti dell'anticorpo oggetto della presente invenzione ed i suoi coniugati possono essere usati con profitto nella terapia tumorale. Perciò l'uso dell'anticorpo e dei suoi frammenti o derivati nella preparazione di un medicamento per il trattamento di tumori esprimenti tenascina costituisce un ulteriore oggetto della presente invenzione.

Allo scopo di effettuare la radioimmunoterapia vengono descritti contestualmente due kit terapeutici: sistematico e locoregionale. Tali kit sono anche noti con il marchio PAGRIT®. Il kit sistematico è composto da 5 flaconi, di cui il flacone 1 contiene l'anticorpo biotinilato o frammenti o derivati di esso secondo la presente invenzione; il flacone 2 contiene avidina, il flacone 3 contiene streptavidina, il flacone 4 contiene albumina umana biotinilata, il flacone 5 contiene biotina DOTA (o derivati della biotina descritti in WO 02/066075). Il kit locoregionale è composto da 3 flaconi, corrispondenti ai flaconi 1, 2, 5, del kit sistematico. I flaconi sono preparati in modo da essere idonei all'iniezione nel soggetto da trattare, preferibilmente un essere umano. Allo scopo di effettuare la radioimmunoterapia viene descritto un metodo, denominato IART (Intraoperative Avidination for Radionuclide Treatment), basato sul trattamento intraoperatorio di pazienti sottoposti a rimozione chirurgica di masse tumorali con i reagenti oggetto

della presente invenzione, da soli od in associazione con gli altri componenti dei kit PAGRIT®.

Il contenitore specifico, preferibilmente nella forma di un flacone idoneo per l'iniezione comprendente l'anticorpo o suoi frammenti in forma biotinilata, costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione.

Secondo una realizzazione della presente invenzione, nei kit terapeutici l'anticorpo biotinilato viene unito ad altri anticorpi antitenascina, preferibilmente diretti verso la regione simile a EGF ("EGF-like") della proteina. Alternativamente l'anticorpo biotinilato può essere accoppiato con altri anticorpi specifici per il tumore. Una descrizione generale di questo tipo di metodo si trova in EP 0 496 074, *European Journal of Nuclear Medicine Vol.26, No4; April, 1999;348-357*, US 5,968,405.

Oggetto della presente invenzione è inoltre l'uso dell'anticorpo monoclonale ST2485 per la acquisizione di immagine per successivi scopi diagnostici ("imaging") tramite immunolocalizzazione in vivo del tumore.

Altro oggetto della presente invenzione è l'uso dell'anticorpo monoclonale ST2485 in combinazione con un secondo anticorpo antitenascina in un test per la produzione di un kit diagnostico per la determinazione dei livelli circolanti di tenascina.

Questi ed altri oggetti della presente invenzione saranno descritti in dettaglio di seguito anche mediante esempi e figure.

Breve descrizione delle figure

Figura 1: rappresentazione schematica della tenascina-C umana e della strategia seguita per generare l'anticorpo simile a BC-2 ("BC-2 like").

Figura 2: analisi SDS-PAGE (a, b) e Western Blot (c, d) in condizioni riducenti e non riducenti dell'anticorpo ST2485. In condizioni riducenti, si osserva una doppia banda a livello della catena leggera dell'anticorpo (b,d).

Figura 3: analisi mediante SDS-PAGE dell'anticorpo ST 2485 sottoposto a deglicosilazione mediante digestione con l'enzima PNGaseF (Peptide-N-Glicosidasi da *Flavobacterium*): si osserva la scomparsa della banda di catena leggera ad alto peso molecolare.

Figura 4: profili cromatografici in idrossiapatite degli anticorpi ST2485 e BC-2.

Figura 5: specificità di legame di ST2485 per la tenascina umana e per il frammento Tn (A₁₋₄-D) mediante analisi Western Blot.

Figura 6: test ELISA di competizione tra ST2485 e BC-2 per il legame alla Tenascina-C (a) o al frammento Tn (A₁₋₄-D) (b).

Figura 7: immunoreattività di ST2485 in confronto al BC-2 su Tenascina-C (a) e sul frammento Tn (A₁₋₄-D) (b).

Figura 8: immunoreattività di ST2485 e BC-2 biotinilati su Tenascina-C (a) e sul frammento Tn(A₁₋₄-D) (b).

Figura 9: reattività crociata ("cross-reactivity") dell'anticorpo ST2485 con la tenascina murina espressa nel tumore LMM3 (carcinoma mammario murino) e nell'intestino normale murino.

Figura 10: protocollo seguito per lo studio di biodistribuzione di ST2485 in topi nudi.

Figure 11 e 11a: biodistribuzione di ST2485 a varie dosi di somministrazione in confronto al BC2. L'accumulo di ST2485 nel tumore, a tutte le dosi somministrate, è almeno 2 volte superiore a quello del BC-2.

Figure 12 e 12a: rapporti tumore/non tumore di ST2485 in confronto al BC2. Tali rapporti sono più elevati per l'anticorpo ST2485, a tutte le dosi somministrate.

Figura 13: test di interferenza (a) e di additività (b) *in vitro* degli anticorpi antitenascina ST2485 e ST2146 mediante test ELISA.

Figure 14 e 14a: test di additività *in vitro* degli anticorpi ST2485 e ST2146 mediante analisi BiaCore.

Figura 15: schema seguito nello studio di additività *in vivo* degli anticorpi ST2485 e ST2146.

Figura 16: additività *in vivo* degli anticorpi ST2485 e ST2146, espressa in ng di anticorpo localizzati per grammo di tumore.

Figura 17: sequenza SEQID 1 della regione variabile della catena leggera di ST2485 (VL).



Figura 18: sequenza SEQID 2 della regione variabile della catena pesante di ST2485 (VH).

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Gli inventori hanno preparato un nuovo anticorpo monoclonale antitenascina umana denominato ST2485, le cui regioni variabili delle catene leggera e pesante hanno rispettivamente sequenza SEQID1 e SEQID2, prodotto dalla linea cellulare di ibridoma cST2485. L' anticorpo è capace di legarsi ad un epitopo antigenico all'interno della regione A1-4-D della tenascina umana.

I frammenti proteolitici dell'anticorpo della presente invenzione sono capaci di legarsi ad un epitopo antigenico all'interno della regione A1-4-D della tenascina umana.

Derivati ricombinanti dell'anticorpo della presente invenzione sono ottenuti secondo metodiche convenzionali note all'esperto del settore. Sono preferiti quei derivati ricombinanti in cui la regione costante murina è sostituita dalla controparte umana, oppure da una componente biologicamente o farmacologicamente attiva, oppure da un membro della famiglia delle avidine.

Secondo la presente invenzione, i derivati coniugati sono ottenuti con metodi convenzionali noti in questo settore. Sono preferiti quei coniugati in cui una porzione biologicamente attiva è legata all'anticorpo. Esempi di porzioni biologicamente attive sono i membri della famiglia delle avidine, un fattore di crescita utile per stimolare effettori immunologici diretti sul tumore (quali G-CSF, GM-CSF), una porzione farmacologicamente attiva, quale per

esempio una tossina, un superantigene, una citochina o ogni altra proteina utile nell'aumentare l'effetto terapeutico antitumorale, farmaci antitumorali, radioisotopi.

Per ulteriori informazioni per la preparazione dei ricombinanti e dei coniugati, si fa riferimento a WO 03/072608.

Secondo la presente invenzione, derivati ricombinanti o coniugati dell'anticorpo monoclonale o suoi frammenti sono anche indicati come "derivati".

In una realizzazione preferita della presente invenzione, l'anticorpo, i suoi frammenti e derivati possono essere biotinilati.

L'anticorpo secondo la presente invenzione, suoi frammenti e derivati possono anche vantaggiosamente contenere marcatori ed agenti diagnostici aggiuntivi.

La presente invenzione comprende anche il DNA codificante l'anticorpo monoclonale o i suoi frammenti come definiti sopra. L'invenzione comprende altresì un vettore contenente detto DNA, una cellula ospite contenente detto vettore.

Vettori e cellule ospiti rientrano nelle conoscenze generali di questo settore.

La presente invenzione comprende anche la proteina codificata dalle sequenze nucleotidiche SEQID 1 e SEQID 2 o suoi frammenti, il DNA che la codifica.

La presente invenzione comprende anche specifiche CDR (Complementary Specific Regions – Regioni Specifiche Complementari).

mentari) dell'anticorpo menzionato sopra e proteine comprendenti dette CDR.

Il procedimento per la preparazione dell'anticorpo secondo la presente invenzione comprende i seguenti stadi:

- a) immunizzazione di un animale, preferibilmente un topo, con il frammento A₁₋₄-D della tenascina umana;
- b) fusione delle cellule somatiche di milza di detto animale con cellule di mieloma non producente immunoglobuline;
- c) selezione dell'anticorpo monoclonale.

L'anticorpo monoclonale ST2485 è prodotto dalla linea cellulare di ibridoma cST2485, identificata sopra.

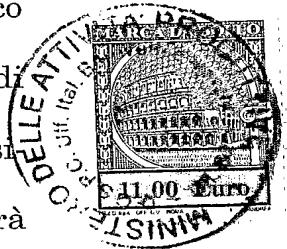
Secondo la presente invenzione l'anticorpo o i suoi frammenti o i suoi derivati, eventualmente biotinilati, sono utilizzati per la preparazione di un prodotto farmaceutico utile al trattamento o diagnosi di una malattia caratterizzata dall'espressione di tenascina. In particolare, detta malattia è un tumore, più in particolare un tumore scelto nel gruppo che comprende glioma, tumore della mammella, carcinomi del polmone, fibrosarcoma e carcinomi a cellule squamose.

In un aspetto preferito, il suddetto prodotto farmaceutico è impiegato nella terapia perioperatoria in due stadi di tumori solidi, descritta nella domanda di brevetto italiano numero RM 2003 A 000196, depositata il 24 aprile 2003. In questo tipo di terapia, si somministrerà l'anticorpo biotinilato, seguito da avidina, costruendo così il "recettore artificiale" per il successivo agente antitumore.

rale vero e proprio. In questo caso, l'agente antitumorale sarà veicolato da biotina, la quale sarà compresa in un composto chimico atto a formare un complesso con l'agente antitumorale e detto di seguito composto di biotina, e che verrà somministrata per via sistemica nella fase postoperatoria. La biotina, infatti, si localizzerà solo dove è presente avidina e in questo caso si è certi che l'avidina è presente nella zona che interessa trattare in quanto introdotta dal chirurgo qualche ora prima (ad es. da 4 a 72 ore) durante l'inter-vento. Questo è un vantaggio in quanto riduce drasticamente i tempi che intercorrono tra rimozione del tumore primario e terapia adiuvante.

Per quanto riguarda gli aspetti industriali della presente invenzione, l'anticorpo qui descritto sarà opportunamente formulato in composizioni farmaceutiche o kit terapeutici o diagnostici, secondo la normale pratica nel settore farmaceutico.

Composizioni farmaceutiche e kit sono del tutto convenzionali in questo settore e possono essere preparate dall'esperto del settore anche solo sulla base delle cognizioni generali. Esempi di composizioni farmaceutiche sono forniti nelle referenze citate nella presente invenzione. Lo stesso si applica di kit. Sono particolarmente preferiti i kit per la radioimmunoterapia di tumori, come descritto nei summenzionati lavori di Paganelli e al., e in EP 0 496 074, WO 02/066075, WO 03/072608, WO 03/075960. Un uso particolare del kit per radioimmunoterapia può essere fatto con il dispositivo descritto in WO 03/069632.

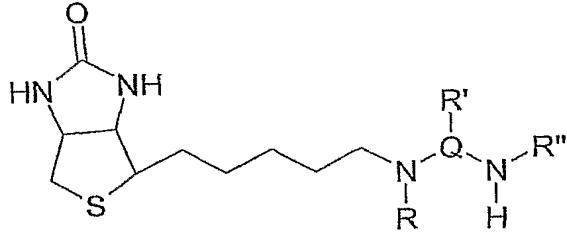


Composizioni farmaceutiche comprendenti l'anticorpo o i suoi derivati o frammenti, eventualmente biotinilati in miscela con almeno un eccipiente o veicolo farmaceuticamente accettabile sono comprese nello scopo della presente invenzione.

In una particolare realizzazione della presente invenzione, sono forniti kit per la radioimmunoterapia sistemica, in particolare la radioimmunoterapia "pretargeting" a tre stadi, comprendenti 5 flaconi, di cui il flacone 1 contiene un anticorpo o suoi frammenti o suoi derivati ricombinanti o suoi coniugati o suoi analoghi, eventualmente biotinilati; il flacone 2 contiene avidina, il flacone 3 contiene streptavidina, il flacone 4 contiene albumina umana biotinilata, il flacone 5 contiene biotina DOTA.

In un'altra realizzazione della presente invenzione, i kit sono per la radioimmunoterapia locoregionale e comprendono 3 flaconi uguali ai flaconi 1, 2 e 5 del kit per la sistemica.

In una realizzazione particolarmente preferita, nel flacone con la biotina DOTA, detta biotina DOTA è il composto di formula (I)

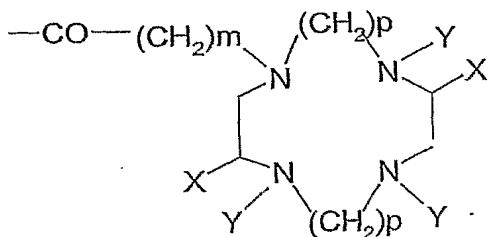


(I)

in cui Q è un gruppo $-(CH_2)_n-$, dove n è un numero intero da 4 a 12, nel qual caso R' non è presente, oppure Q è scelto nel grup-

po che consiste di $-(CH_2)_a-CH(R')_b-(CH_2)_b-$, dove a e b sono indipendentemente numeri interi tra 0 e n, R' è come definito di seguito, oppure Q è cicloesile, fenile, nel qual caso R' è un sostituente sull'anello cicloesilico o fenilico;

R è idrogeno o $-\Lambda$, dove $-\Lambda$ è un macrociclo di formula (II),



(II)

dove i vari Y, che possono essere uguali o diversi, sono scelti nel gruppo che consiste di idrogeno, alchile C₁-C₄ lineare o ramificato, $-(CH_2)_m-COOH$, dove m è un numero intero da 1 a 3, X è idrogeno, oppure il gruppo $-CH_2-U$, dove U è scelto nel gruppo che consiste di metile, etile, p-amminofenile, oppure X è il gruppo $-(CHW)_o-Z$, dove o è un numero intero da 1 a 5, W è idrogeno, metile o etile, Z è un gruppo eterociclico a 5 o 6 membri contenente uno o più eteroatomi scelti tra O, N-R₁, dove R₁ è idrogeno oppure alchile C₁-C₄ lineare o ramificato, ed S; oppure Z è scelto nel gruppo che consiste di $-NH_2$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, oppure $-S-R_2$, dove R₂ è alchile C₁-C₄ lineare o ramificato;

p è il numero 2 o 3;

R' è scelto nel gruppo che consiste di idrogeno, alchile C₁-C₄ lineare o ramificato, $-(CH_2)_q-T$, in cui T è scelto nel gruppo che consiste di $-S-CH_3$, $-OH$, $-COOH$, e q è il numero 1 o 2;

R" ha gli stessi significati di R', con le seguenti condizioni, se R è -Λ, R" è idrogeno, se R è idrogeno, R" è -Λ, oppure R e R" sono rispettivamente -(CH₂)_r-Λ (per R), dove r è un numero intero da 4 a 12, e -Λ (per R'), essendo Q un gruppo -(CH₂)_n-, dove n è un numero intero da 4 a 12.

Questi composti sono descritti in WO 02/066075.

In una realizzazione particolarmente preferita, nel flacone con l'avidina, questa è un dimero di avidina nel quale due molecole di avidina sono legate tramite i gruppi -NH₂ per mezzo di suberato, oppure un dimero di avidina nel quale due molecole di avidina sono legate tramite i gruppi -COOH per mezzo di polietilene glicol con peso molecolare di 3.400, come descritto in WO 03/075960.

Nei kit secondo l'invenzione, l'anticorpo, i suoi frammenti proteolitici, i suoi derivati, eventualmente biotinilati, può essere in combinazione con altri anticorpi antitenascina, preferibilmente diretti verso la regione EGF-like della proteina, oppure in combinazione altri anticorpi specifici per il tumore.

Tutti gli aspetti di questa invenzione, oltre alla terapia di tumori che esprimono tenascina, si applicano anche nella diagnosi, in particolare nella metodica di immunolocalizzazione di tumori, ad esempio l'acquisizione di immagini ("imaging").

E' un oggetto della presente invenzione anche un contenitore, preferibilmente nella forma di un flacone idoneo per l'iniezione, comprendente un anticorpo o i suoi frammenti proteolitici o i suoi derivati, eventualmente biotinilati, e/o radiomarcati.

In un altro aspetto dell'invenzione, l'anticorpo o i suoi frammenti, derivati ricombinanti, analoghi è utilizzato in combinazione con un secondo anticorpo tenascina-specifico, in un saggio in vitro ELISA di tipo "sandwich", in condizioni in cui detto secondo anticorpo si lega ad un secondo epitopo antigenico della tenascina, allo scopo di determinare i livelli di tenascina circolante, in particolare le isoforme contenenti la regione A 1-4-D.



Il seguente esempio illustra ulteriormente l'invenzione.

Esempio 1

Allo scopo di generare un nuovo ibridoma con la specificità del BC2 ma non producente una catena leggera non funzionale, sono stati immunizzati topi Balb/c con il frammento A₁₋₄-D della tenascina umana, contenente l'epitopo riconosciuto dal BC2 (Siri, A., et al., *Nucl. Acid Res.*, 19(3):525-531, 1991; Balza, E., et al., *FEBS*, 332:39-43, 1993). La rappresentazione schematica della tenascina-C umana e la strategia usata per generare l'anticorpo BC-2 like sono illustrate nella Figura 1. Splenociti di topi immunizzati con il frammento Tn(A₁₋₄-D) sono stati fusi con cellule di mieloma non producente immunoglobuline Sp2/0-Ag14 secondo i metodi standard (Cianfriglia, M., et al., *Methods Enzymol.*, 121:193-210, 1986), e la popolazione di ibridomi ottenuta è stata sottoposta a screening mediante test ELISA su tenascina purificata da cellule di melanoma umano SK-Mel 28 (ICLC HTL99010). Gli ibridomi secernenti anticorpi antitenascina sono stati clonati per due volte mediante diluizione limitante in terreno di crescita contenente

FCS e per due volte in terreno privo di proteine di origine animale (Animal Derived Component Free Medium HyClone, HyQ^R Per-bio).

La produzione del materiale di riferimento ST2485 è stata effettuata coltivando le cellule dell'ibridoma cST2485 in bioreattore da 2 l; due successivi subclonaggi a diluizione limitante della cST2485 Post Production Cell Bank (PPCB) hanno condotto alla selezione del subclone cST2485/A3e/A12f, utilizzato per la produzione della Master Cell Bank (MCB) e della Working Cell Bank (WCB).

ST2485 è un'immunoglobulina di topo di isotipo IgG1/k.

La Figura 2 mostra l'analisi SDS-PAGE (a, b) e Western blot (c, d) in condizioni riducenti e non riducenti dell'anticorpo ST2485. In condizioni riducenti (b, d) si osserva una doppia banda a livello della catena leggera dell'anticorpo; l'analisi Western Blot dimostra che le due bande sono immunoreattive come catene leggere di immunoglobulina. L'analisi cromatografia in idrossiapatite dell'anticorpo ST2485, riportata in figura 3, conferma, attraverso il picco leggermente asimmetrico, una lieve eterogeneità dell'anticorpo. Nella stessa analisi, l'anticorpo BC2 mostra invece un profilo nettamente eterogeneo, in cui si distinguono tre picchi, di cui il solo picco 1 corrisponde all'anticorpo omogeneo, totalmente funzionale.

Per definire la natura della eterogeneità dell'anticorpo ST 2485, un campione di esso è stato sottoposto a digestione dei residui N-glicosidici con l'enzima PNGase F (Peptide-N-glicosidasi da

Flavobacterium). La digestione enzimatica è stata effettuata mediante il kit di deglicosilazione Prozyme (cat. N°GE51001), nelle condizioni indicate dal produttore: circa 8 µg di ST2485 e 5 mU di enzima sono stati messi a reagire in 10 µl di miscela di reazione, tutta la notte a 37 °C. L'anticorpo ST2485, digerito e non, è stato corso su gel di poliacrilammide al 12% in condizioni riducenti. Il gel è stato colorato con Comassie Brilliant Blue.

La digestione ha determinato la scomparsa della banda di catena leggera ad alto peso molecolare, come mostrato dall'analisi SDS-PAGE in condizioni riducenti mostrata nella figura 4. Questo dato dimostra che le due bande di catena leggera dell'anticorpo ST 2485 corrispondono alla variante glicosilata (ad alto peso molecolare) e non glicosilata (a basso peso molecolare) della stessa. L'esistenza di un potenziale sito di N-glicosilazione è stata confermata anche dai dati di sequenza del cDNA della immunoglobulina (Figura 17).

La regione variabile della catena leggera kappa è stata amplificata a partire dal cDNA circolarizzato utilizzando una coppia di inneschi ("primers") (5' GGAAAGATGGATACAGTTGGT-G, 5' CAAGAGCTTCAACAGGAATGAG) che riconoscono la regione costante dell'anticorpo come descritto da M. Sassano e al. *Nucl. Ac. Res. (1994) 22, 1768-1769.*

Il legame di ST2485 alla regione A₍₁₋₄₎ -D della tenascina è specifico, come dimostra l'analisi Western blot riportato in Figura 5. L'anticorpo si lega alla tenascina umana intera e al frammento

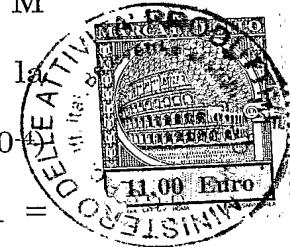
$A_{(1-4)}$ -D, ma non al frammento EGF-like della stessa proteina, contenete l'epitopo riconosciuto dall' anticorpo BC4.

L'anticorpo ST2485 lega la tenascina umana in un epitopo distinto o parzialmente condiviso con il BC2, come dimostra il saggio ELISA di competizione tra i due anticorpi mostrato in Figura 6. L'anticorpo BC-2 biotinilato, a concentrazione stabilita in esperimenti preliminari, viene dispensato con BC-2 (curva 1) o ST2485 (curva 2) non biotinilati in concentrazioni crescenti su piastre sensibilizzate con l'antigene: tenascina-C (a), o frammento $Tn(A_{1-4}-D)$ (b). Il legame dell'anticorpo biotinilato viene misurato dopo l'aggiunta di HRP-streptavidina e del relativo substrato cromogeno TMB. L' anticorpo ST2485 determina l'inibizione del 40% del legame di BC-2 alla tenascina-C o al frammento di $Tn(A_{1-4}-D)$.

L'immunoreattività di ST2485 è stata valutata in confronto al BC-2 mediante saggio ELISA su tenascina-C e sul frammento $Tn(A_{1-4}-D)$, mostrata nella Figura 7. Gli anticorpi ST2485, BC-2 e le immunoglobuline normali di topo (nM IgG), sono stati dispensati a concentrazione crescente su piastre sensibilizzate con tenascina-C (a) o con frammento $Tn(A_{1-4}-D)$ (b); l'aggiunta dell'anticorpo secondario anti-topo marcato con fosfatasi-alcalina e del relativo substrato cromogenico (pNPP) ha consentito di determinare la curva dose-risposta degli anticorpi. La quantità di ST2485 necessaria per ottenere 1,0 OD è circa 13 volte inferiore alla quantità di BC-2 su tenascina intera (a), e circa 10 volte inferiore alla quantità di BC-2 sul frammento $Tn(A_{1-4}-D)$ (b).

L'affinità dell'anticorpo ST2485 è stata valutata sia su tenascina-C sia sul frammento Tn(A₁₋₄-D) mediante analisi BIACore. Sulla tenascina-C la KD1 di ST2485 è $9,77 \times 10^{-10}$ M (ka1 = $6,02 \times 10^5$; kd1 = $5,88 \times 10^{-4}$), mentre la KD1 di BC-2 è $2,54 \times 10^{-7}$ M (ka1 = $9,85 \times 10^3$; kd1 = $2,5 \times 10^{-3}$). Sul frammento di Tn(A₁₋₄-D) la KD1 di ST2485 è $9,72 \times 10^{-10}$ M (ka1 = $3,28 \times 10^5$; kd1 = $3,19 \times 10^{-7}$), mentre la KD1 di BC2 è $7,39 \times 10^{-8}$ M (ka1 = $2,68 \times 10^4$; kd1 = $1,93 \times 10^{-3}$).

Il mantenimento dell'immunoreattività dopo la biotinilazione costituisce un requisito fondamentale dell'anticorpo usato nel pre-targeting, pertanto il comportamento di ST2485 biotinilato (8,3 biotine/molecola) è stato valutato mediante saggio ELISA e BIACore in confronto al BC2 biotinilato (7,6 biotine/molecola). Con riferimento alla Figura 8, gli anticorpi ST2485 e BC-2 biotinilati e non biotinilati e le immunoglobuline normali di topo (nM IgG) sono stati dispensati a concentrazione crescente su piastre sensibilizzate con tenascina-C (a) o con frammento Tn(A₁₋₄-D) (b); l'aggiunta dell'anticorpo secondario anti-topo marcato con fosfatasi-alcalina e del relativo substrato cromogenico (pNPP) ha consentito di determinare la curva dose-risposta di ciascun anticorpo biotinilato rispetto al non biotinilato (immunoreattività residua). L'immunoreattività residua su tenascina-C di ST2485 e BC2 biotinilati è rispettivamente pari a 76% e 88%. Sul frammento di Tn(A₁₋₄-D): l'immunoreattività residua è rispettivamente 73% e 83% per ST2485 e BC-2.



L'analisi BIACore su tenascina intera degli anticorpi biotinilati mostra un'affinità $KD1 = 2,88 \times 10^{-9}$ M per ST2485 biotinilato ($ka1 = 2,8 \times 10^5$; $kd1 = 8,07 \times 10^{-4}$) ed un'affinità $KD1 = 3,71 \times 10^{-7}$ M per BC-2 biotinilato ($ka1 = 6,0 \times 10^3$; $kd1 = 2,23 \times 10^{-3}$). ST2485 biotinilato mantiene quindi buone caratteristiche di immunoreattività ed affinità, conservando un'affinità per la tenascina circa 100 volte superiore a quella del BC2 biotinilato.

Studi di immunoistochimica su diversi tumori umani (mammella, polmone, stomaco, colon) hanno dimostrato la localizzazione del ST2485 a livello della matrice extracellulare, analogamente a quanto riportato per il BC2 (*Natali, PG, et al., Int. J. Cancer, 47: 811-16, 1991*). Tali studi hanno inoltre dimostrato la capacità del ST2485 di dare reazione incrociata ("cross-reaction") con la tenascina murina, anche quella espressa nei tessuti normali del topo, come si può osservare in Figura 9. Sezioni fissate in formalina di tumore LMM3 (carcinoma mammario murino) e di intestino normale murino sono state incubate con 10 μ g/ml di ST2485 o di anticorpo IgG1 murino normale (controllo). Dopo incubazione con l'anticorpo secondario anti-topo biotinilato e il complesso avidina-biotina-perossidasi (Vectastain *Elite ABC kit*) il legame con la tenascina è stato rivelato con l'aggiunta del substrato colorimetrico DAB (Vector). Il contrasto è stato eseguito con ematossilina Mayer's. Le sezioni di LMM3 e di intestino murino sono positive con ST2485 ma non con l'anticorpo di controllo. Non è stato possibile effettuare questi studi in confronto al BC-2 in quanto tale an-

ticorpo non riconosce sezioni di tessuto fissate ed incluse in paraffina. La capacità del ST2485 di riconoscere la tenascina murina, anche quella espressa dai tessuti normali, rende maggiormente significativi i risultati ottenuti negli studi di biodistribuzione dell'anticorpo nel modello murino di seguito descritti.

Allo scopo di valutare la capacità dell'anticorpo di localizzarsi nella massa tumorale, sono stati effettuati studi di biodistribuzione di ST2485 e BC-2 biotinilati e marcati con I^{125} . Tali studi sono stati condotti in topi nudi in cui sono stati impiantati tumori umani esprimenti tenascina, secondo il protocollo schematizzato in Figura 10.

Agli animali sono state inoculate per via sottocutanea 4×10^6 cellule di colon carcinoma umano HT-29 in 0,1 ml di soluzione fisiologica sterile. Dopo 15 giorni, quando il tumore ha raggiunto una massa di circa 200 mg, gruppi di cinque animali hanno ricevuto per via endovenosa ^{125}I -BC2, ^{125}I -ST2485, o ^{125}I -immunoglobuline normali di topo (nM Ig), tutti biotinilati (7-9 biotine/mol) ed a cinque diverse dosi: 0,2-0,5-1-2-5 μg /topo in 100 μl di PBS sterile. Cinque giorni dopo la somministrazione degli anticorpi gli animali sono stati sacrificati e sono stati prelevati campioni di sangue, milza, rene, fegato, tumore per la determinazione della radioattività presente. 24 ore prima del sacrificio gli animali hanno ricevuto una somministrazione i.v. di avidina in 100 μl di PBS sterile, in dose 100 volte superiore a quella dell'anticorpo (chase).

I risultati, riportati nelle figure 11 e 11a, mostrano che sia BC-2 che ST2485 si localizzano specificamente nel tumore, in modo dipendente dalla dose (le quantità di anticorpo sono espresse come % della dose iniettata per grammo di tessuto: %ID/gr). Inoltre ST2485 mostra una maggiore localizzazione nel tumore rispetto a BC-2 a tutte le dosi saggiate, mantenendo sempre un rapporto tumore/non tumore più elevato (Figure 12 e 12a). In particolare alla dose di 1 µg/topo l'accumulo di ST2485 nel tumore è pari al 16% della dose iniettata, mentre l'accumulo di BC2 non supera il 5% a nessuna delle dosi saggiate. Alla dose di 1 µg/topo il rapporto tumore/sangue per ST2485 è superiore a 20 (dose ottimale), mentre per l'anticorpo BC-2 tale rapporto non supera 6 a nessuna delle dosi saggiate. Negli altri organi i rapporti tumore/non tumore per ST2485 alla dose di 1 µg/topo sono 9, 26, 43, rispetto a milza, rene, fegato rispettivamente. Per BC-2 invece tali rapporti sono sempre inferiori a 7, a tutte le dosi saggiate. I rapporti tumore/non tumore sono riportati nelle Figure 12 e 12a.

Allo scopo di valutare la possibilità di un utilizzo combinato nei metodi PAGRIT® e IART degli anticorpi antitenascina ST2485 e ST2146, quest'ultimo diretto verso un epitopo localizzato nella regione EGF-like della proteina (*De Santis, R., et al., Br. J. Cancer, 88: 996-1003, 2003, WO 03/072608*), sono stati effettuati esperimenti di additività in vitro ed in vivo dei due anticorpi. La Figura 13 mostra in due prove ELISA effettuate su piastre sensibilizzate con tenascina C l'assenza di interferenza epitopica tra gli anti-

corpi ST2485 ed ST2146 (a) e la natura additiva del loro legame all'antigene (b). Per la valutazione dell'interferenza (a) l'anticorpo ST2485 biotinilato, in concentrazioni crescenti, è stato dispensato su micropiastra sensibilizzata con tenascina C in assenza (1) ed in presenza (2) di ST2146 in concentrazione saturante: le curve 1 e 2 sovrapposte indicano assenza di interferenza epitopica tra i due anticorpi, in quanto il legame di ST2485 biotinilato alla tenascina non è influenzato dalla presenza di ST2146 (e viceversa; dati non mostrati). La curva 3 mostra il segnale ottenuto seminando ST 2485 biotinilato in presenza di ST2485 saturante non biotinilato (controllo). In figura 13b è rappresentato il test di additività, in cui gli anticorpi ST2485 ed ST2146 biotinilati sono stati dispensati, in dose saturante, separatamente o insieme, su micropiastra sensibilizzata con tenascina C: la miscela dei due anticorpi produce un segnale pari alla somma dei singoli, dimostrando che il legame dei due anticorpi è additivo.

L'additività *in vitro* dei due anticorpi è stata sagggiata anche mediante analisi BIACore, come riportato nelle Figure 14 e 14a. La tenascina è stata immobilizzata sul chip (CM5 sensor chip, Biosense) secondo il metodo descritto (*De Santis R. et al., Br J Cancer 88: 996-1003, 2003*). Sono state effettuate due iniezioni consecutive del primo anticorpo (ST2485 in a, ST2146 in c) in concentrazioni saturanti (10 μ M), alle quali è seguita l'iniezione del secondo anticorpo antitenascina (ST2146 in a; ST2485 in c). I sensorgrammi a) e c) mostrano che i due anticorpi sono in grado di legarsi ai rispet-



tivi epitopi in modo additivo, come dimostra l'aumento del segnale di risonanza prodotto da ogni singolo anticorpo. I sensorgrammi b) e d) rappresentano le iniezioni di ST2485 e ST2146 rispettivamente seguite ciascuna dal rispettivo anticorpo di controllo isotipico, mIgG2b e mIgG1.

Lo studio di additività dei due anticorpi ST2485 e ST2146 è stato effettuato anche *in vivo* nel modello animale precedentemente descritto. Lo schema dello studio è riportato in Figura 15, mentre i risultati ottenuti sono mostrati in Figura 16, espressi in ng di anticorpo per grammo di tumore. I dati confermano l'additività dei due anticorpi anche nel modello animale. La miscela dei due anticorpi marcati presenta infatti un accumulo nel tumore pari al 93% del valore teorico (somma matematica dei due singoli anticorpi marcati). Gruppi di animali di controllo sono stati trattati con miscele di anticorpo radiomarcato e secondo anticorpo freddo per evidenziare eventuali interferenze.

La regione variabile della catena leggera kappa è stata amplificata a partire dal cDNA circolarizzato utilizzando una coppia di primers (inneschi) (5' GGGAAAGATGGATACAGTTGGTG 3', 5' CAAGAGCTTCAACAGGAATGAG 3') che riconoscono la regione costante della catena leggera dell'anticorpo, come descritto da M. Sassano, e al., *Nucl. Ac. Res.*, (1994) 22, 1768-1769.

La regione variabile della catena pesante gamma è stata amplificata a partire dal cDNA circolarizzato utilizzando una coppia di primers (5' ATGGAGTTAGTTGGGCAGCAG 3', 5' GCACA-

ACCACCATACTGAGAAG 3') che riconoscono la regione costante della catena pesante dell'anticorpo, come descritto da M. Sassano e al. *Nucl. Ac. Res. (1994) 22, 1768-1769.*

La Figura 17 mostra la sequenza SEQID 1 della regione variabile della catena leggera (VL) di ST2485.

La Figura 18 mostra la sequenza SEQID 2 della regione variabile della catena pesante (VH) di ST2485.

La caratterizzazione comparativa di ST2485 rispetto a BC-2 dimostra che l'anticorpo ST2485 possiede le seguenti caratteristiche:

- riconosce un epitopo all'interno della regione A₁₋₄-D della tenascina umana, vicino o parzialmente sovrapposto a quello del BC-2;
- è un anticorpo omogeneo per quanto riguarda la composizione delle catene leggera e pesante, in quanto la eterogeneità osservata è dovuta a varianti di glicosilazione della catena leggera;
- è più immunoreattivo del BC-2;
- ha maggiore affinità per l'antigene rispetto al BC-2;
- è paragonabile al BC-2 per quanto riguarda il mantenimento della immunoreattività dopo la biotinilazione;
- è superiore al BC-2 per quanto riguarda la localizzazione tumorale nel modello animale;

- si lega in modo additivo con l'anticorpo monoclonale anti-tenascina ST2146 alla tenascina C, sia *in vitro* che *in vivo* nel modello animale.

Bibliografia

Balza E., Siri A., Ponassi M., Caocci F., Linnala A., Virtanen I., Zardi L. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for different epitopes of human tenascin. *FEBS*, 332:39-43, 1993.

Bourdon M.A., Wikstrand C.J., Furthmayr H., Matthews T.J., Bigner D.D. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res.*, 43(6):2796-2805, 1983.

Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E.S., Caliceti P., Veronese F.M., Cremonesi M., Chiolerio F., Nardone E., Siccardi A.G., Paganelli G. Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. *British Journal of Cancer*, 78(2): 189-197, 1998.

Chiquet-Ehrismann R, Mackie E. J., Pearson C.A., Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell*, 47(1):131-139, 1986.

Cianfriglia M., Mariani M., Armellini D., Massone A., Lafata M., Presentini L. and Antoni G. Methods for high frequency production of soluble antigen-specific hybridomas; specificities and

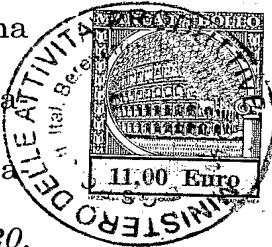
affinities of monoclonal antibodies obtained. *Methods Enzymol.*, 121:193-210, 1986.

Cremonesi M., Ferrari M., Chinol M., Stabin M. G., Grana C., Prisco G., Robertson C., Tosi G., Paganelli G. Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin: dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients. *Eur. J. Nucl. Med.*, 26(2):110-120, 1999.

De Santis R., Anastasi A.M., D'Alessio V., Pelliccia A., Albertoni C., Rosi A., Leoni B., Lindsdell R., Petronzelli F., Dani M., Verdoliva A., Ippolito A., Campanile A., Manfredi V., Esposito A., Cassani G., Chinol M., Paganelli G. e Carminati P. Novel antineurotactin antibody with increased localisation for Pretargeted Antibody-Guided Radioimmuno Therapy (PAGRIT). *Br. J. Cancer*, 88, 996-1003, 2003.

Di Massimo A.M., Di Loreto M., Pacilli A., Raucci G., D'Alatri L., Mele A., Bolognesi A., Polito L., Stirpe F. and De Santis R. Immunoconjugates made of an anti-EGF-receptor Monoclonal Antibody and Type 1 RIPs from *Saponaria ocymoides* or *Vaccaria pyramidata*. *British J. Cancer*, 75(6):822-828, 1997.

Ferrer C., Anastasi A.M., Di Massimo A.M., Bullo A., Di Loreto M., Raucci G., Pacilli A., Rotondaro L., Mauro S., Mele A. and De Santis R. Expression and characterization of a mouse/human chimeric antibody specific for EGF receptor. *J. Biotechnol.*, 52: 51-60, 1996.



Grana C., Chinol M., Robertson C., Mazzetta C., Bartolomei M., De Cicco C., Fiorenza M., Gatti M., Caliceti P. e Paganelli G. Pretargeted adjuvant radioimmunotherapy with Yttrium-90-biotin in malignant glioma patients: A pilot study. *Br. J. Cancer*, 86: 207-212, 2002.

Natali PG., Nicotra M.R., Bigotti A., Botti C., Castellani P., Risso A.M. e Zardi L. Comparative analysis of the expression of the extracellular matrix protein tenascin in normal human fetal, adult and tumor tissues. *Int. J. Cancer*, 47: 811-816, 1991.

Paganelli G., Bartolomei M., Ferrari M., Cremonesi M., Broggi G., Maira G., Sturiale C., Grana C., Prisco G., Gatti M., Caliceti P., Chinol M. Pre-targeted locoregional radioimmunotherapy with ⁹⁰Y-biotin in glioma patients: Phase I study and preliminary therapeutic results. *Cancer Biother. & Radiopharm.*, 16(3):227-235, 2001.

Paganelli G., Grana C., Chinol M., Cremonesi M., De Cicco C., De Braud F., Robertson C., Zurruda S., Casadio C., Zoboli S., Siccardi A. G., Veronesi U. Antibody-guided three step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur. J. Nucl. Med.*, 26(4):348-357, 1999.

Paganelli G., Magnani P., Zito F., Lucignani G., Sudati F., Truci G., Motti E., Terreni M., Pollo B., Giovanelli M., Pre-targeted immunodetection in glioma patients: tumor localization and single-photon emission tomography imaging of [99mTc]PnAO-biotin. *Eur. J. Nucl. Med.*, 21(4):314-21, 1994.

Parente D., D'Alatri L., Di Massimo A.M., Saccinto MP., Novelli S., Pacilli A., Mele A. and De Santis R. Production and *in vitro* characterization of a recombinant immunotoxin made of a single chain anti-EGF receptor antibody and a type ribosome-inactivating protein (RIP) from filamentous fungus *Aspergillus clavatus*. *Anticancer Research*, 17(6A):4073-4074, 1997.

Penichet, ML., Kang YS., Pardridge WM., Morrison SL., and Shin S.U. An Antibody-Avidin Fusion Protein Specific for the Transferrin Receptor serves as a Delivery Vehicle for Effective Brain Targeting: Initial Applications in Anti-HIV Antisense Drug Delivery to the Brain 1. *J. Immunol.*, 163: 4421-4426, 1999.

Ramos D.M., Chen B., Regezi J., Zardi L., Pytela R., Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 75:680-687, 1998.

Riva P., Arista A., Sturiale C., Moscatelli G., Tison V., Mariani M., Seccamani E., Lazzari S., Fagioli L., Franceschi G., et al. Treatment of intracranial human glioblastoma by direct administration of ¹³¹I-labelled anti-tenascin monoclonal antibody BC-2. *Int. J. Cancer*, 51(1):7-13, 1992.

Riva P., Franceschi G., Arista A., Frattarelli M., Riva N., Cremonini A.M., Giuliani G., Casi M. Local application of radiolabelled monoclonal antibodies in the treatment of high grade malignant glioma: a six-year clinical experience. *Cancer*, 80 (12 Suppl):2733-42, 1997.

Riva P., Franceschi G., Frattarelli M., Riva N., Guiducci G., Cremonini A.M., Giuliani G., Casi M., Gentile R., Jekunen A.A., Kairemo K.J. ^{131}I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma-phase I and II study. *Acta Oncol.*, 38(3):351-9, 1999.

Siri A., Carnemolla B., Saginati M., Leprini A., Casari G., Baralle F. and Zardi L. Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitope recognized by two monoclonal antibodies. *Nucl. Acid Res.*, 19(3):525-531, 1991.

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo monoclonale antitenascina umana, preferibilmente detto anticorpo è murino, le cui regioni variabili delle catene leggera e pesante hanno rispettivamente le sequenze SEQID1 e SEQID2, i suoi frammenti proteolitici capaci di legarsi ad un epitopo antigenico all'interno della regione A1-4-D della tenascina umana, suoi derivati ricombinanti, suoi coniugati e suoi analoghi funzionali similari capaci di legarsi ad un epitopo antigenico all'interno della regione A1-4-D della tenascina umana.

2. Frammenti dell'anticorpo della rivendicazione 1, eventualmente contenenti marcatori ed agenti diagnostici aggiuntivi.

3. Derivato ricombinante dell'anticorpo secondo la rivendicazione 1, in cui la regione costante murina è sostituita dalla componente umana.

4. Derivato ricombinante dell'anticorpo secondo la rivendicazione 1, in cui la regione costante murina è sostituita da una componente biologicamente attiva.

5. Derivato ricombinante dell'anticorpo secondo la rivendicazione 1, in cui la regione costante murina è sostituita da una componente farmacologicamente attiva.

6. Derivato ricombinante dell'anticorpo secondo la rivendicazione 1, in cui la regione costante murina è sostituita da un membro della famiglia delle avidine.

7. Derivati coniugati dell'anticorpo della rivendicazione 1 con sostanze biologicamente attive.



8. Anticorpo biotinilato della rivendicazione 1 o frammenti biotinilati della rivendicazione 2, o derivati biotinilati delle rivendicazioni 4-7.

9. DNA codificante l'anticorpo della rivendicazione 1 o frammenti della rivendicazione 2.

10. Un vettore contenente il DNA della rivendicazione 9.

11. Cellula ospite contenente il vettore della rivendicazione 10.

12. Proteina codificata dalle sequenze nucleotidiche SEQID 1 e SEQID 2 o suoi frammenti.

13. DNA codificante la proteina o i suoi frammenti della rivendicazione 12.

14. Specifiche CDR (Complementary Specific Regions) dell'anticorpo della rivendicazione 1 e proteine comprendenti dette CDR.

15. Ibridoma che produce l'anticorpo della rivendicazione 1, depositato presso il Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rossana Benzi 10, Genova - Italia il 12 Novembre 2003 secondo il Trattato di Budapest, con numero di deposito PD03003.

16. Procedimento per la preparazione dell'anticorpo della rivendicazione 1 che comprende

a) immunizzazione di un animale con il frammento A₁₋₄-D della tenascina umana;

b) fusione delle cellule somatiche di milza di detto animale con cellule di mieloma non producente immunoglobuline;

c) selezione dell'anticorpo monoclonale.

17. Uso dell'anticorpo o di suoi frammenti proteolitici o di suoi derivati ricombinanti o di suoi coniugati o di suoi analoghi della rivendicazione 1, eventualmente biotinilati, o dei frammenti della rivendicazione 2, eventualmente biotinilati, o dei derivati biotinilati delle rivendicazioni 4-7 per la preparazione di un prodotto farmaceutico utile al trattamento o diagnosi di una malattia caratterizzata dall'espressione di tenascina.

18. Uso secondo la rivendicazione 17, in cui detta malattia è un tumore.

19. Uso secondo la rivendicazione 18, in cui detto tumore è scelto nel gruppo costituito da glioma, tumore della mammella, carcinomi del polmone, fibrosarcoma e carcinomi a cellule squamose.

20. Uso dell'anticorpo o di suoi frammenti proteolitici o di suoi derivati ricombinanti o di suoi coniugati o di suoi analoghi della rivendicazione 1, eventualmente biotinilati, o dei frammenti della rivendicazione 2, eventualmente biotinilati, o dei derivati biotinilati delle rivendicazioni 4-7 per la preparazione di un prodotto farmaceutico utile per la terapia perioperatoria in due stadi di tumori solidi.

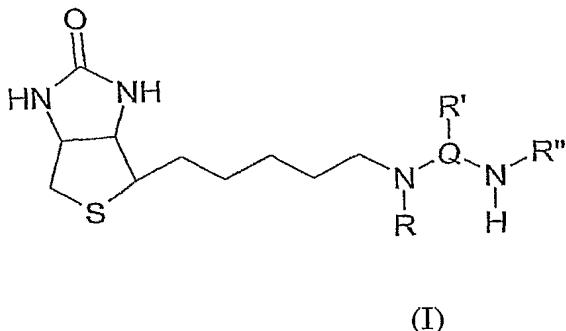
21. Composizioni farmaceutiche o diagnostiche comprendenti un anticorpo o suoi frammenti proteolitici o suoi derivati ricombinanti o suoi coniugati o suoi analoghi della rivendicazione 1, eventualmente biotinilati, o frammenti della rivendicazione 2,

eventualmente biotinilati, o derivati biotinilati delle rivendicazioni 4-7 in miscela con almeno un veicolo e/o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

22. Kit per la radioimmunoterapia sistemica, particolare la radioimmunoterapia "pretargeting" a tre stadi, comprendente 5 flaconi, di cui il flacone 1 contiene un anticorpo o suoi frammenti proteolitici o suoi derivati ricombinanti o suoi coniugati o suoi analoghi della rivendicazione 1, eventualmente biotinilati, o frammenti della rivendicazione 2, eventualmente biotinilati, o derivati biotinilati delle rivendicazioni 4-7; il flacone 2 contiene avidina, il flacone 3 contiene streptavidina, il flacone 4 contiene albumina umana biotinilata, il flacone 5 contiene biotina DOTA.

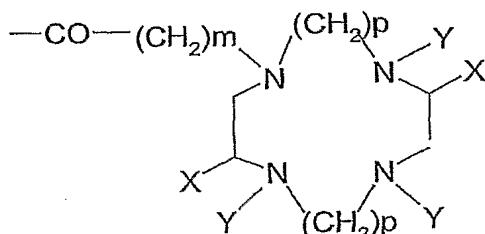
23. Kit per la radioimmunoterapia locoregionale comprendente 3 flaconi, di cui flacone 1 contiene un anticorpo o suoi frammenti proteolitici o suoi derivati ricombinanti o suoi coniugati o suoi analoghi della rivendicazione 1, eventualmente biotinilati, o frammenti della rivendicazione 2, eventualmente biotinilati, o derivati biotinilati delle rivendicazioni 4-7; il flacone 2 contiene avidina, il flacone 3 contiene biotina DOTA.

24. Kit secondo la rivendicazione 22 o 23, in cui rispettivamente nel flacone 5 o nel flacone 3, detta biotina DOTA è il composto di formula (I)



in cui Q è un gruppo $-(CH_2)_n-$, dove n è un numero intero da 4 a 12, nel qual caso R' non è presente, oppure Q è scelto nel gruppo che consiste di $-(CH_2)_a-CH(R')_b-(CH_2)_b-$, dove a e b sono indipendentemente numeri interi tra 0 e n, R' è come definito di seguito, oppure Q è cicloesile, fenile, nel qual caso R' è un sostituente sull'anello cicloesilico o fenilico;

R è idrogeno o $-\Lambda$, dove $-\Lambda$ è un macrociclo di formula (II),



(II)

dove i vari Y, che possono essere uguali o diversi, sono scelti nel gruppo che consiste di idrogeno, alchile C₁-C₄ lineare o ramificato, $-(CH_2)_m-COOH$, dove m è un numero intero da 1 a 3, X è idrogeno, oppure il gruppo $-CH_2-U$, dove U è scelto nel gruppo che consiste di metile, etile, p-amminofenile, oppure X è il gruppo $-(CHW)_o-Z$, dove o è un numero intero da 1 a 5, W è idrogeno, metile o etile, Z è un gruppo eterociclico a 5 o 6 membri contenente uno o più eteroatomi scelti tra O, N-R₁, dove R₁ è idrogeno oppure alchile

C_1-C_4 lineare o ramificato, ed S; oppure Z è scelto nel gruppo che consiste di $-NH_2$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, oppure $-S-R_2$, dove R_2 è alchile C_1-C_4 lineare o ramificato;

p è il numero 2 o 3;

R' è scelto nel gruppo che consiste di idrogeno, alchile C_1-C_4 lineare o ramificato, $-(CH_2)_q-T$, in cui T è scelto nel gruppo che consiste di $-S-CH_3$, $-OH$, $-COOH$, e q è il numero 1 o 2;

R'' ha gli stessi significati di R' , con le seguenti condizioni, se R è $-\Lambda$, R'' è idrogeno, se R è idrogeno, R'' è $-\Lambda$, oppure R e R'' sono rispettivamente $-(CH_2)_r-\Lambda$ (per R), dove r è un numero intero da 4 a 12, e $-\Lambda$ (per R'), essendo Q un gruppo $-(CH_2)_n-$, dove n è un numero intero da 4 a 12.

25. Kit secondo una delle rivendicazioni 22-24, in cui il flacone 3 contiene un dimero di avidina nel quale due molecole di avidina sono legate tramite i gruppi $-NH_2$ per mezzo di suberato.

26. Kit secondo una delle rivendicazioni 22-24, in cui detto flacone 3 contiene un dimero di avidina nel quale due molecole di avidina sono legate tramite i gruppi $-COOH$ per mezzo di polietilene glicol con peso molecolare di 3.400.

27. Kit secondo la rivendicazione 22 o 23, nel quale l'anticorpo o suoi frammenti proteolitici o suoi derivati ricombinanti o suoi coniugati o suoi analoghi della rivendicazione 1, eventualmente biotinilati, o frammenti della rivendicazione 2, eventualmente biotinilati, o derivati biotinilati delle rivendicazioni 4-7, è in com-

binazione con altri anticorpi antitenascina, preferibilmente diretti verso la regione EGF-like della proteina.

28. Kit secondo la rivendicazione 22 o 23, nel quale l'antico-
rpo o suoi frammenti proteolitici o suoi derivati ricombinanti o
suoi coniugati o suoi analoghi della rivendicazione 1, eventualmen-
te biotinilati, o dei frammenti della rivendicazione 2, eventualmen-
te biotinilati, o derivati biotinilati delle rivendicazioni 4-7, è in
combinazione altri anticorpi specifici per il tumore.

29. Uso dell'anticorpo o di suoi frammenti proteolitici o di
suoi derivati ricombinanti o di suoi coniugati o di suoi analoghi
della rivendicazione 1, eventualmente biotinilati, o dei frammenti
della rivendicazione 2, eventualmente biotinilati, o dei derivati bio-
tinilati delle rivendicazioni 4-7, nella preparazione di composizioni
utili nella metodica di immunolocalizzazione di tumori.

30. Contenitore, preferibilmente nella forma di un flacone
idoneo per l'iniezione, comprendente un anticorpo o suoi frammen-
ti proteolitici o suoi derivati ricombinanti o suoi coniugati o suoi
analoghi della rivendicazione 1, eventualmente biotinilati e/o ra-
diomarcati, o frammenti della rivendicazione 2, eventualmente
biotinilati, o derivati biotinilati delle rivendicazioni 4-7.

31. Metodo di acquisizione di immagine di un tumore
("imaging") comprendente la somministrazione dell'anticorpo o di
suoi frammenti proteolitici o di suoi derivati ricombinanti o di suoi
coniugati o di suoi analoghi della rivendicazione 1, eventualmente
biotinilati, o dei frammenti della rivendicazione 2, eventualmente

biotinilati, o dei derivati biotinilati delle rivendicazioni 4-7 ad una persona affetta o sospetta di essere affetta da tumore e individuazione dello stesso.

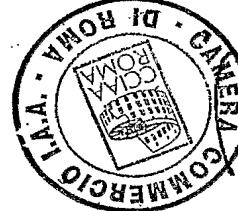
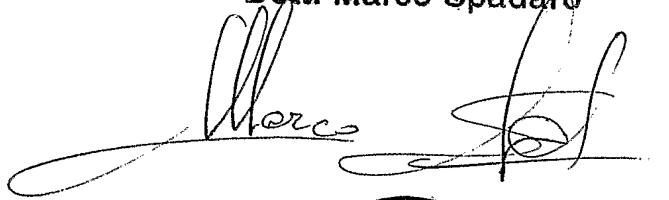
32. Metodo della rivendicazione 31, in cui l'anticorpo o i suoi frammenti proteolitici o i suoi derivati ricombinanti o i suoi coniugati o i suoi analoghi sono radiomarcati.

33. Combinazione comprendente l'anticorpo o i suoi frammenti proteolitici o i suoi derivati ricombinanti o suoi coniugati o suoi analoghi della rivendicazione 1 o frammenti della rivendicazione 2 o derivati delle rivendicazioni 4-7 e un secondo anticorpo tenascina-specifico.

34. Uso della combinazione della rivendicazione 33 in un saggio *in vitro* ELISA di tipo "sandwich", in condizioni in cui detto secondo anticorpo si lega ad un secondo epitopo antigenico della tenascina, allo scopo di determinare i livelli di tenascina circolante, in particolare le isoforme contenenti la regione A 1-4-D.

p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.

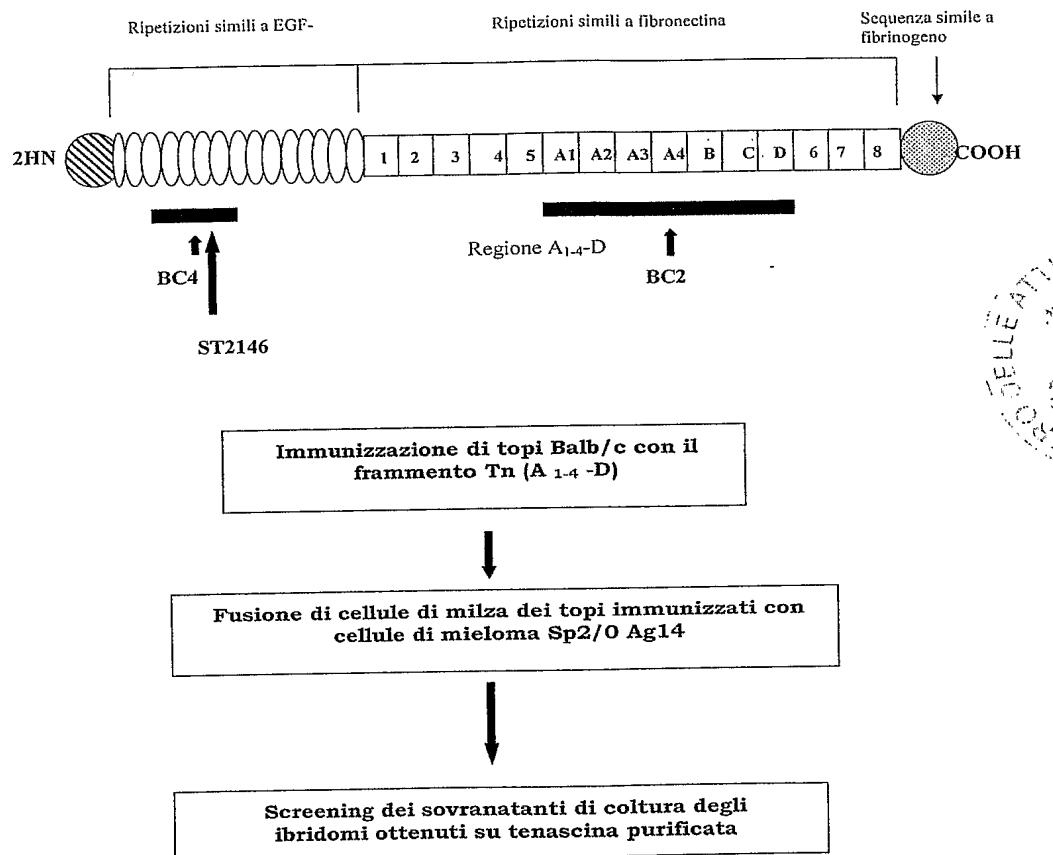
Dott. Marco Spadaro



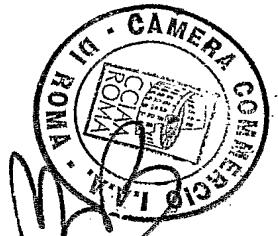
RM 2004 A 000105

Figura 1

Rappresentazione schematica della tenascina-C umana e della strategia seguita per la generazione di anticorpi BC2-like



p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.



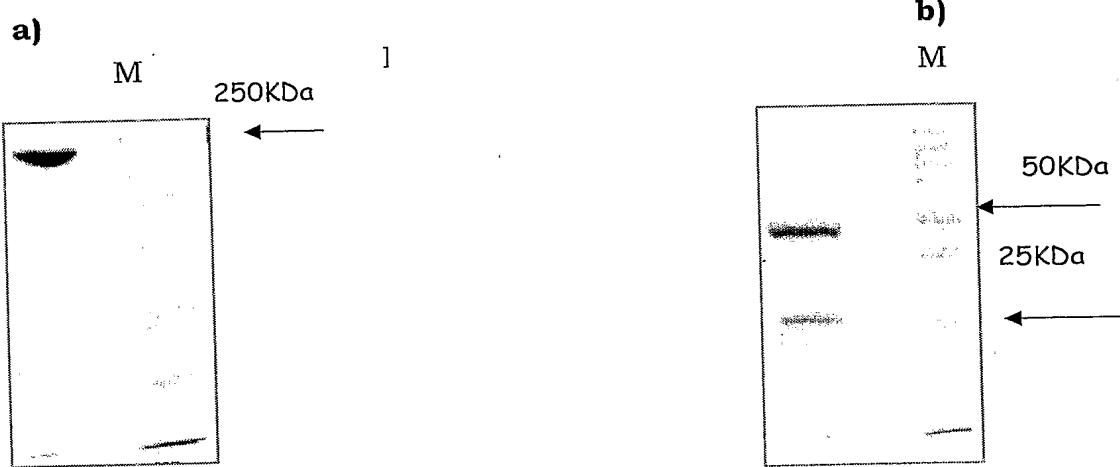
[Handwritten signatures]

Figura 2

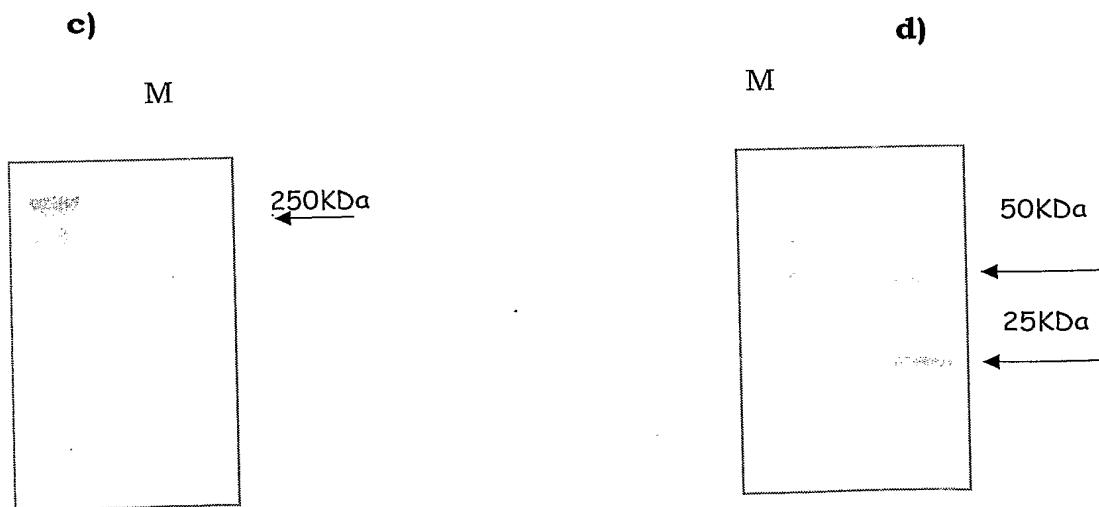
Analisi SDS-PAGE e Western Blot dell'anticorpo ST2485, in condizioni riducenti (b, d) e non riducenti (a, c).

RMF 2006 4000105

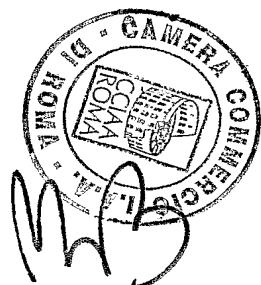
SDS-PAGE



Western Blot



M: standard di pesi molecolari



p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.

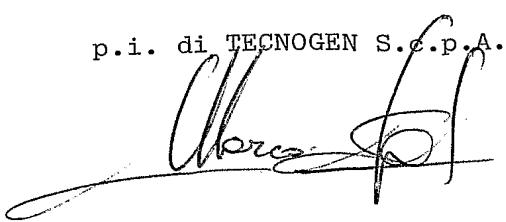
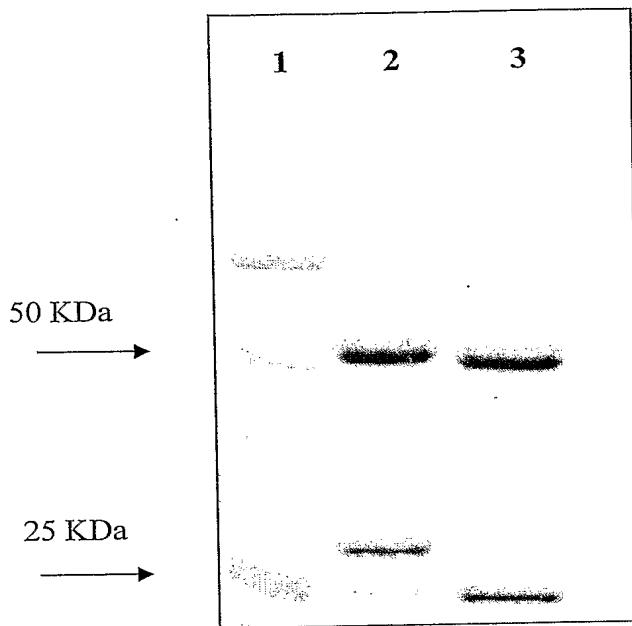


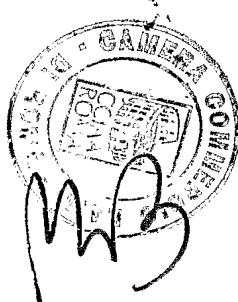
Figura 3

Digestione dell'anticorpo ST2485 con l'enzima Peptide-N-glicosidasi da *Flavobacterium* (PNGase F).



1: Marker di pesi molecolari
2: ST2485 non digerito
3: ST2485 digerito con PNGaseF

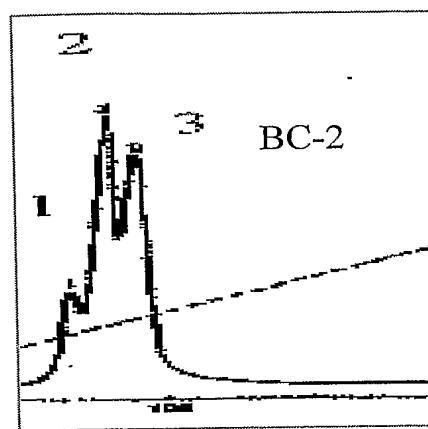
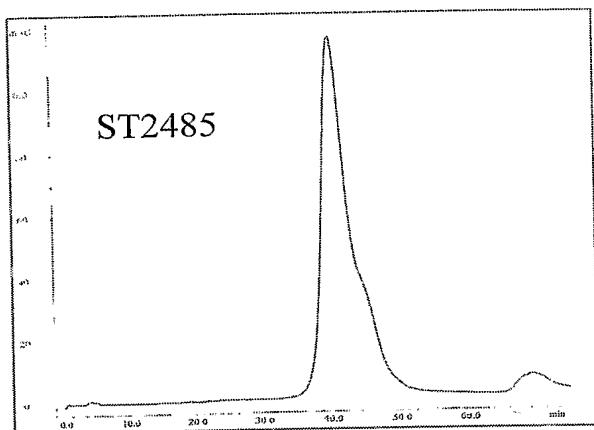
p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.



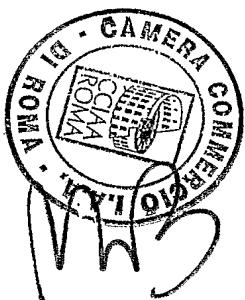
[Handwritten signature]

Figura 4

Cromatografia su idrossiapatite degli anticorpi antitenascina BC-2 e ST2485.



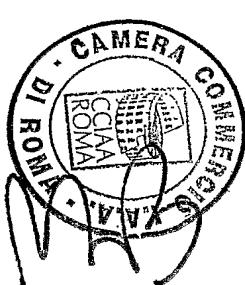
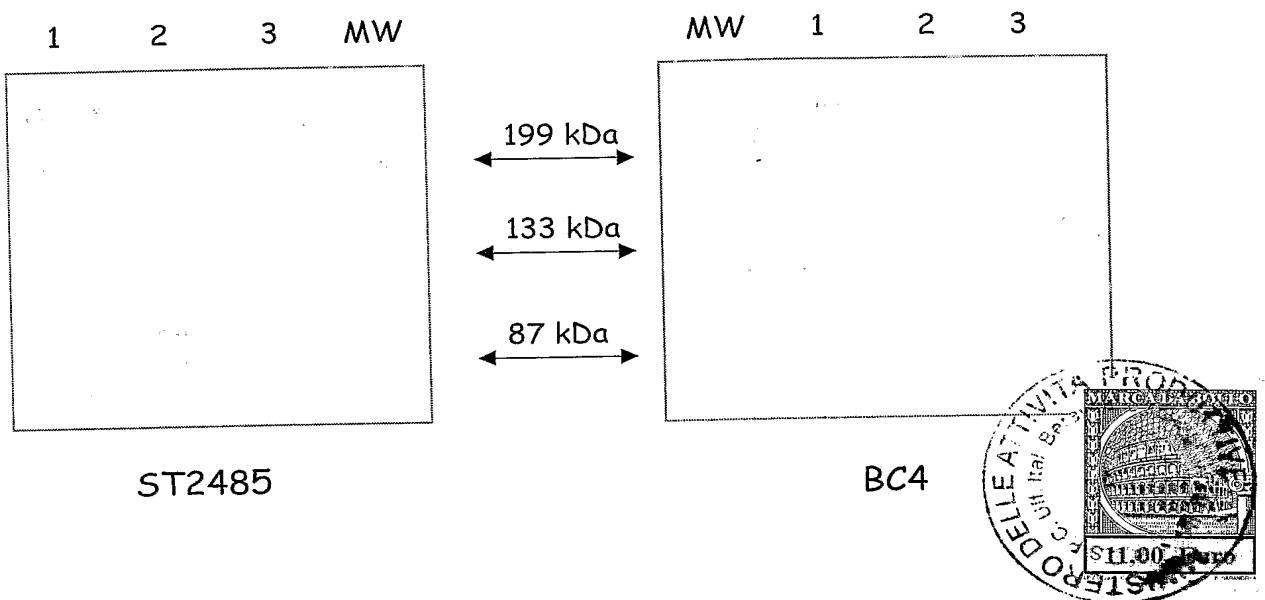
p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.



RM 2004 A 000105

Figura 5

Analisi Western Blot dell'anticorpo antitenascina ST2485.



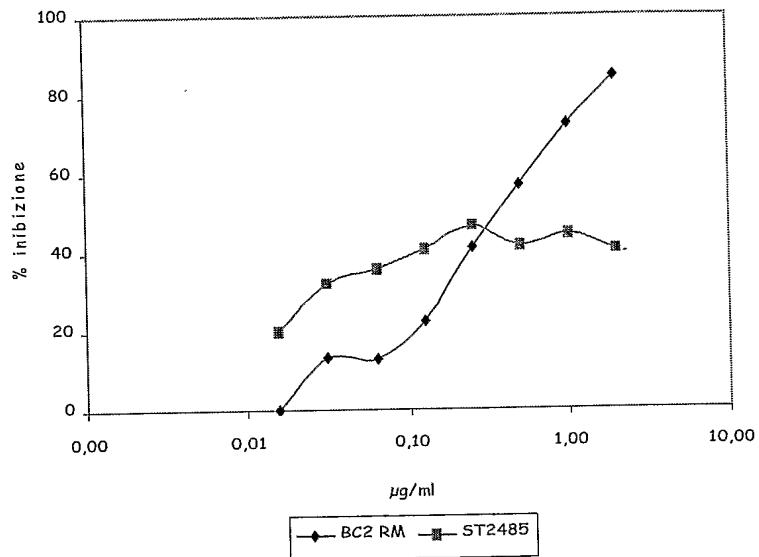
p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.

Merco

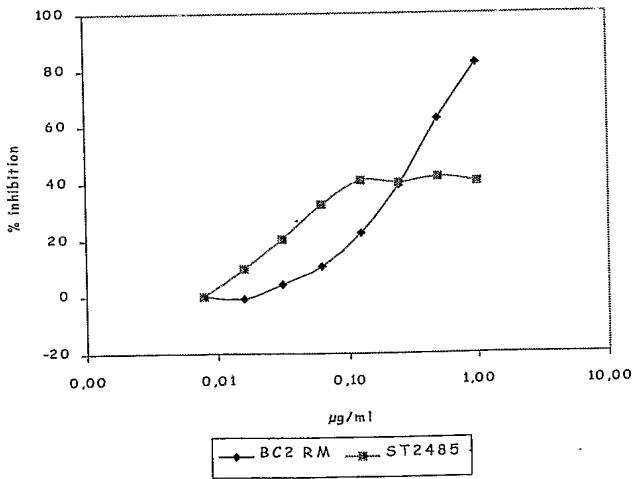
Figura 6

Test ELISA competitivo tra ST2485 e BC-2 per il legame
all'antigene.

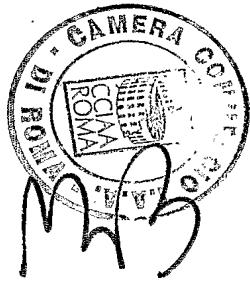
a)



b)



p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.



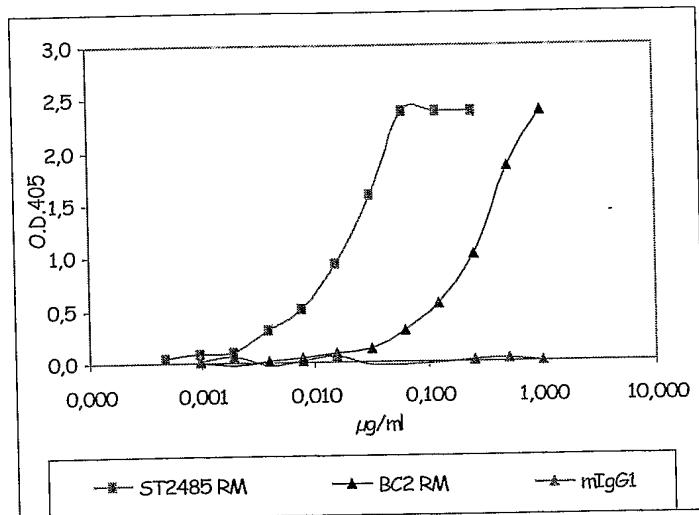
Merco *AS*

RM 2004 A 000105

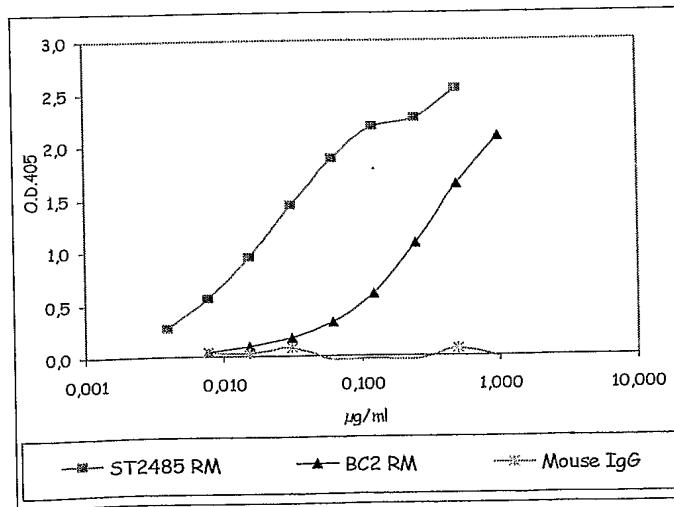
Figura 7

Immunoreattività dell'anticorpo ST2485 in confronto al BC-2, su tenascina C (a) e sul frammento Tn (A₁₋₄-D) (b).

a)



b)



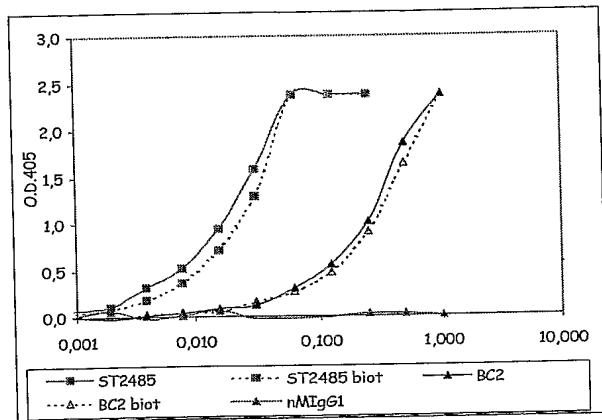
p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.



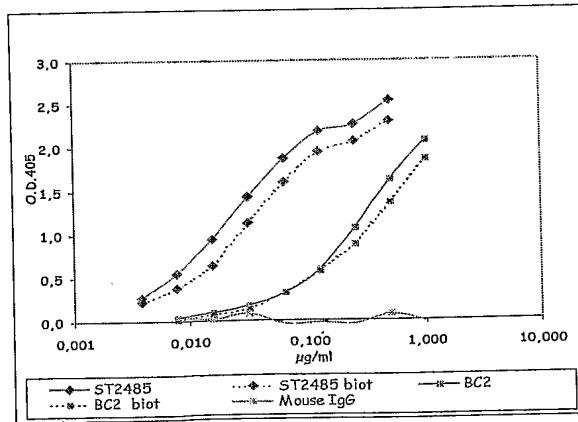
Merce

Figura 8

Immureattività degli anticorpi ST2485 e BC-2 biotinilati e non biotinilati, su tenascina-C (a) e sul frammento Tn(A₁₋₄-D) (b).

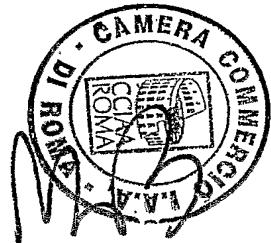


a)



b)

p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.



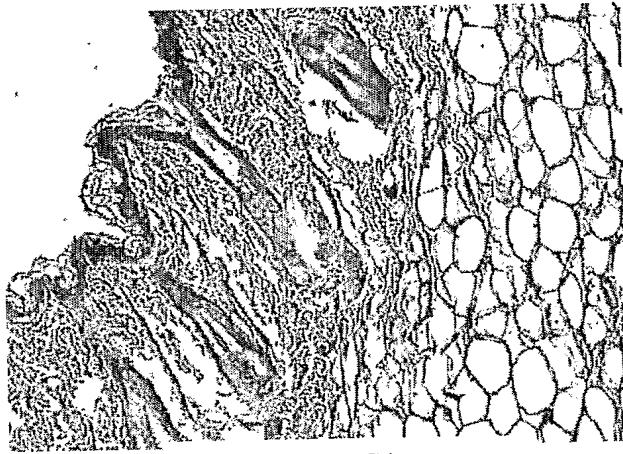
Urcz

RM 2004 A 000105
tenascina murina.

Figura 9

Reattività crociata dell'anticorpo ST2485 con la tenascina murina.

LMM3/ ST2485

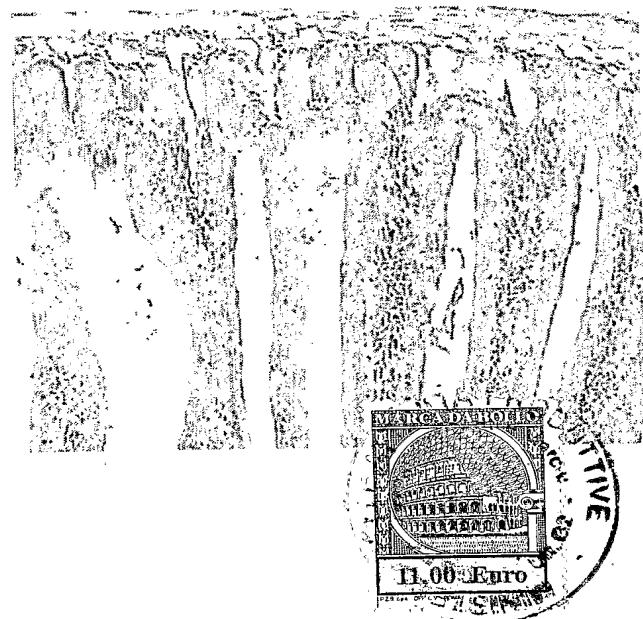
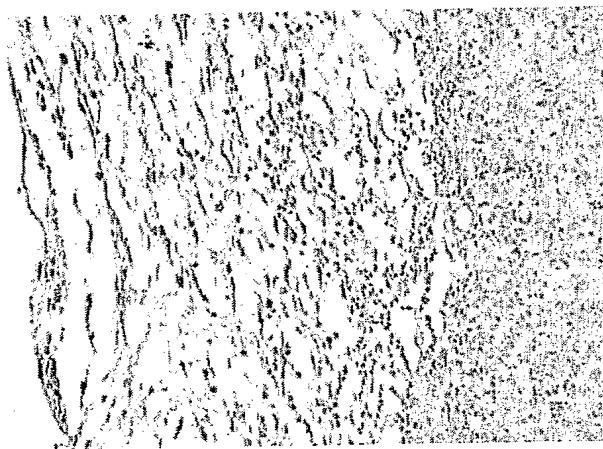


LMM3/ mIgG1

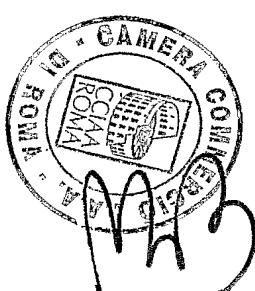
Intestino normale/ ST2485



Intestino normale/ mIgG1



p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.



p.i. di TECNOGEN S.c.p.

Figura 10

Protocollo dello studio di biodistribuzione degli anticorpi ST2485 e BC-2 biotinilati in topi nudi in cui è stato impiantato un tumore esprimente tenascina umana.

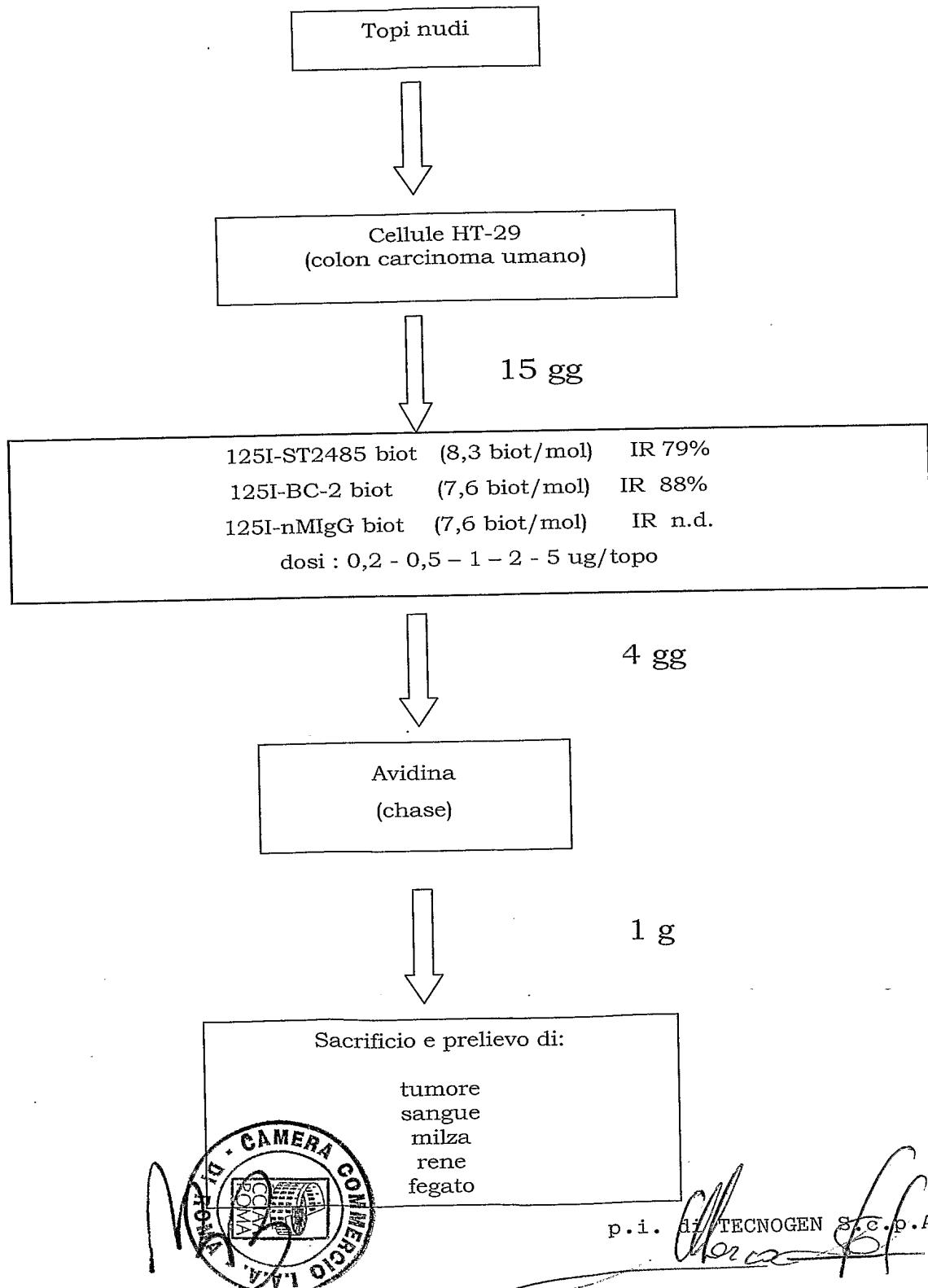
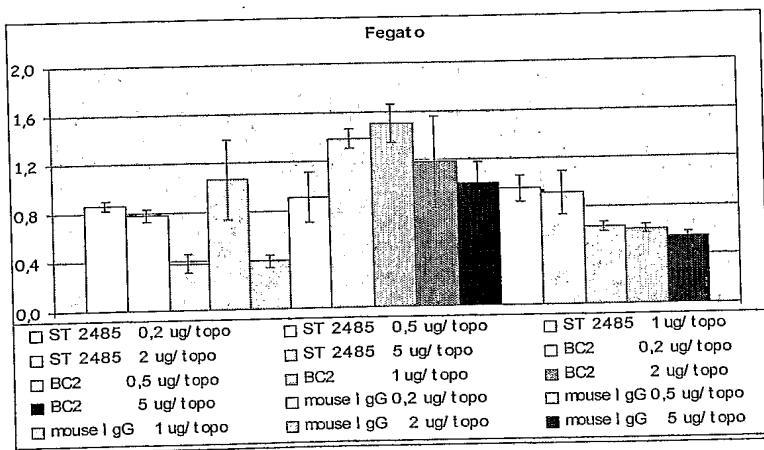
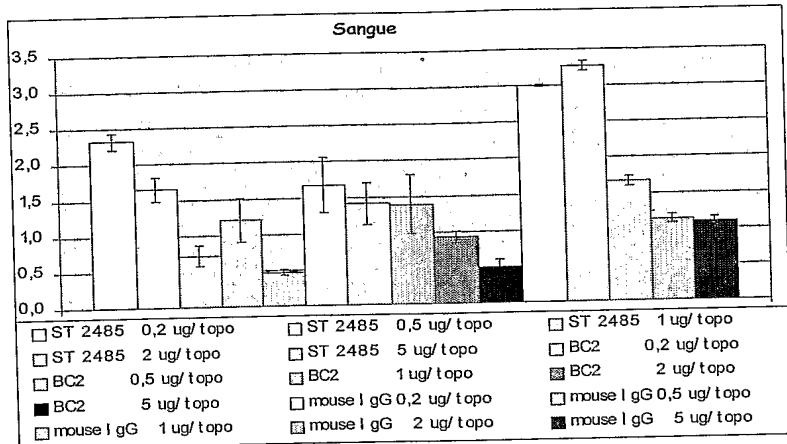


Figura 11

Biodistribuzione di ST2485 e BC-2 biotinilati in topi nudi trapiantati con un tumore umano esprimente tenascina. La quantità dell'anticorpo è espressa come percentuale della dose iniettata per grammo di tessuto (% I.D./gr).



p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.

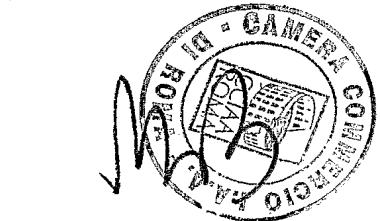
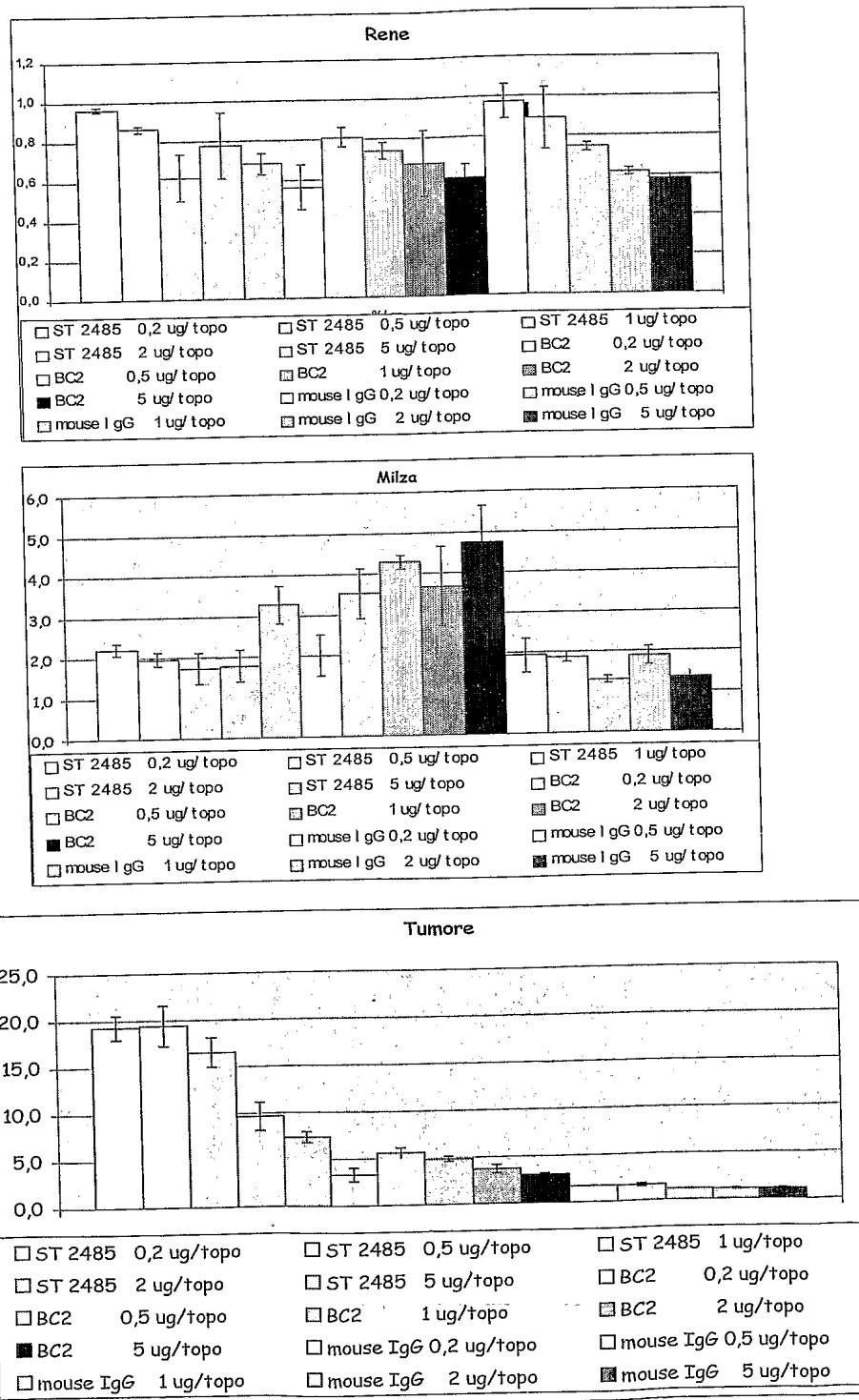


Figura 11a

RM 2004 A 000105



p.i. d/ TECNOGEN S.c.p.A.

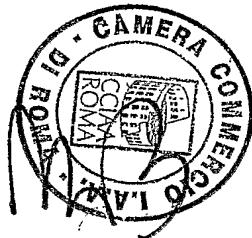
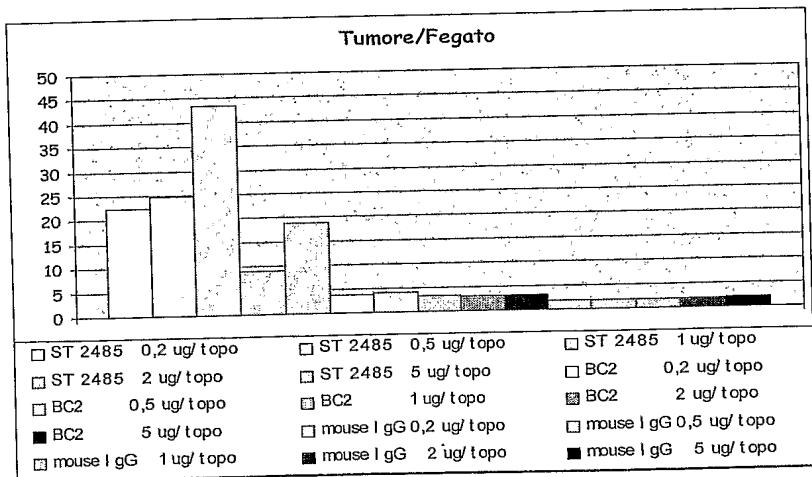
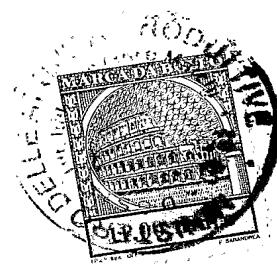
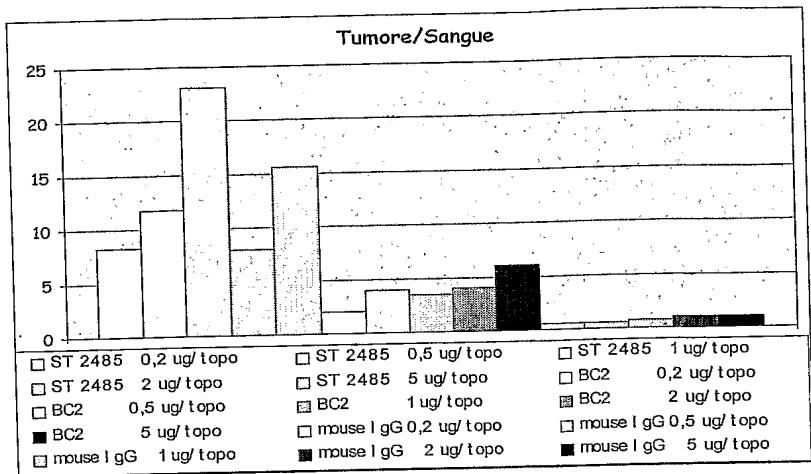


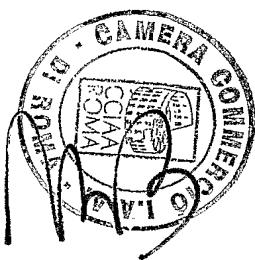
Figura 12

Biodistribuzione di ST2485 e BC-2 biotinilati in topi nudi: rapporti tumore/non tumore.

FM 2004 A 000105

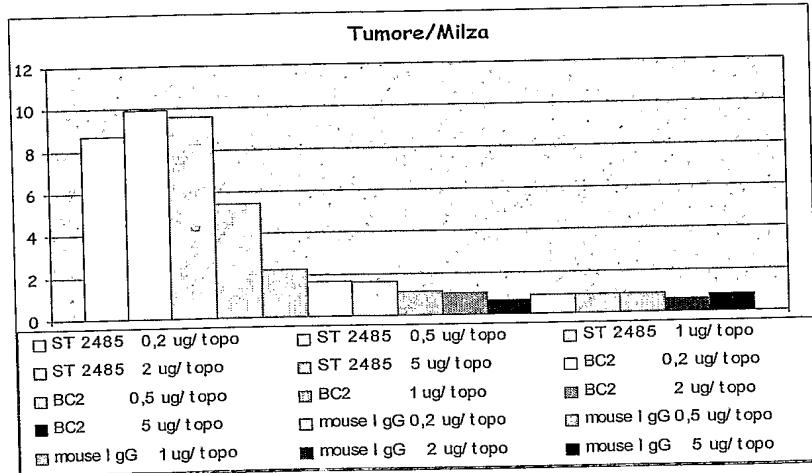
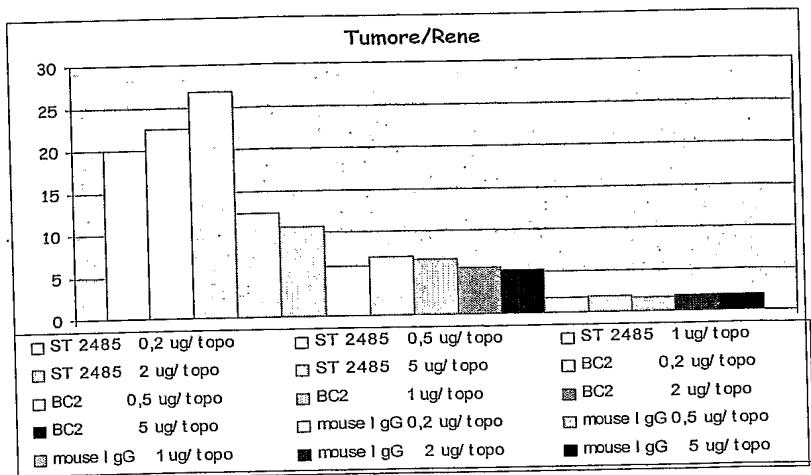


p.i. di TECNOGEN S.p.A.



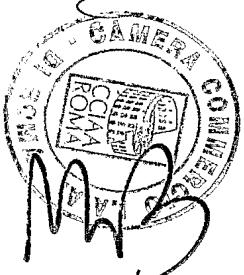
Marco S.

Figura 12a



p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.

Marco S.

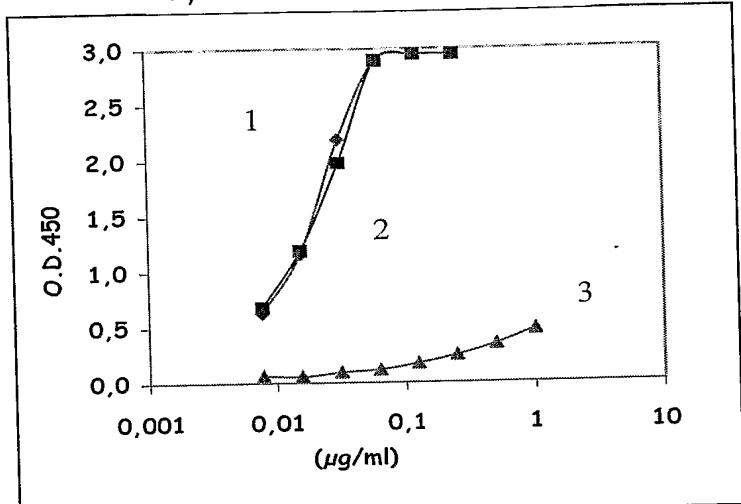


RM 2004 A 000105

Figura 13

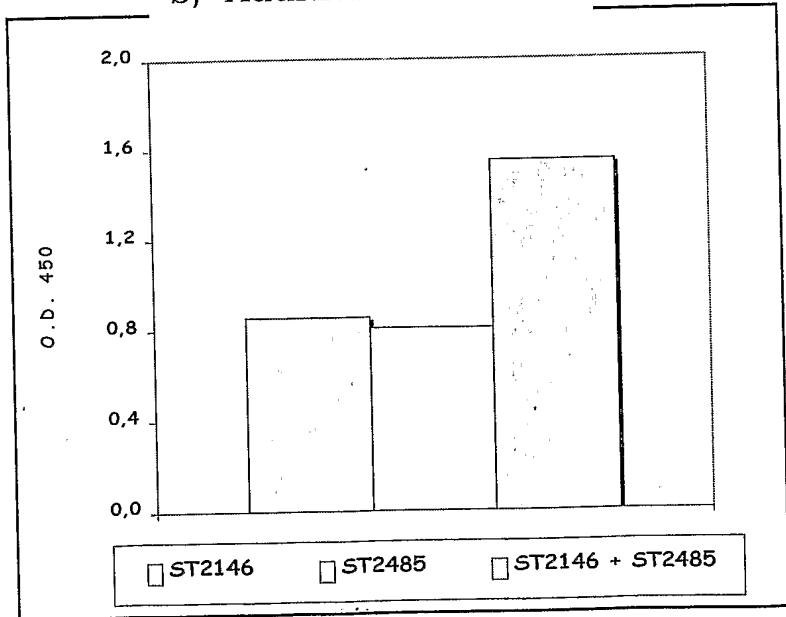
Valutazione *in vitro* dell' interferenza (a) e dell' additività (b) degli anticorpi antitenascina ST2485 e ST2146 mediante test ELISA.

a) Interferenza



1: ST2485 biot. + ST2146; 2: ST2485 biot.
3: ST2485 biot. + ST2485

b) Additività

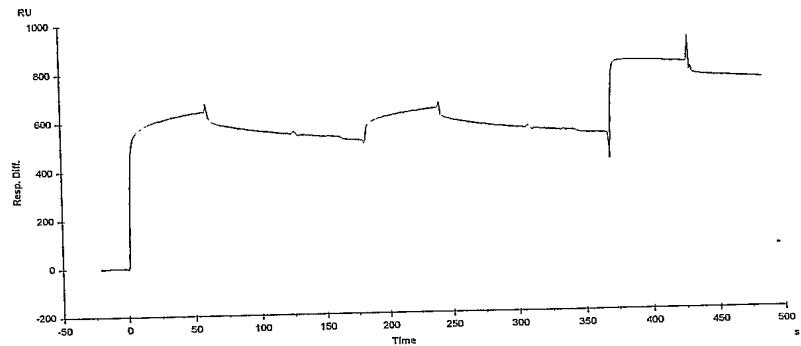


p.i. da TECNOGEN S.c.p.A.

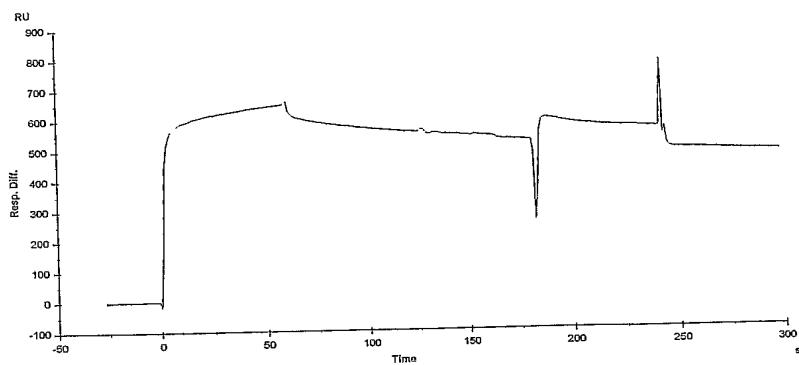
RU 2004 A 000105

Figura 14

Additività *in vitro* mediante BIACore del legame degli anticorpi ST2485 e ST2146 alla tenascina

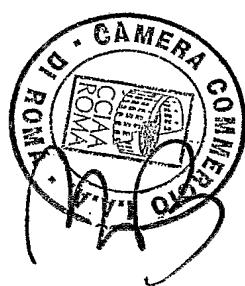


a)



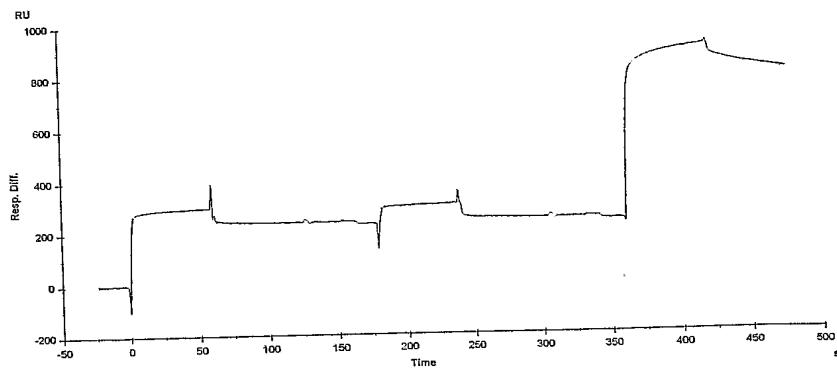
b)

p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.

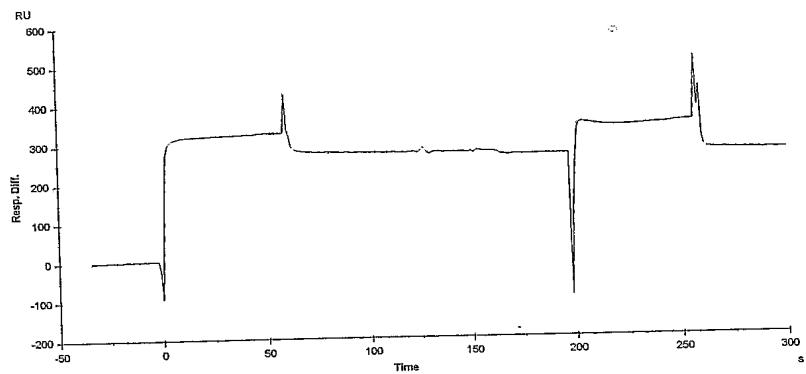


Merce

Figura 14a



c)



d)



p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.

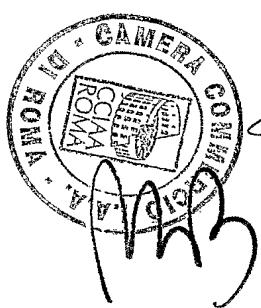


Figura 15

RM 2004 4000105

Rappresentazione schematica dello studio di additività in vivo nel
modello animale

Topi nudi trapiantati con un colon carcinoma umano (HT29) esprimente tenascina



Somministrazione i.v. di anticorpi biotinilati radiomarcati, singolarmente o in miscelle, ciascuno alla dose di 2ug/topo:

125I-ST2485
125I-ST2146
125I-ST2485 + 125I-ST2146
125I-ST2485+ ST2146
125I-ST2146+ ST2485
125I-ST2485+ nM IgG
125I-ST2146+ nM IgG
125I-nM IgG



6 gg

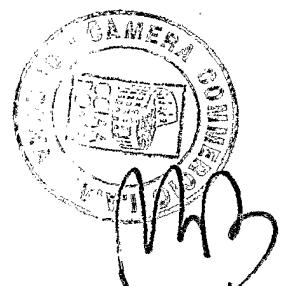
Somministrazione i.v. di avidina in dose 100x rispetto
all'anticorpo (chase)



1 gg

Sacrificio e prelievo di:
tumore, sangue, milza, rene,
fegato

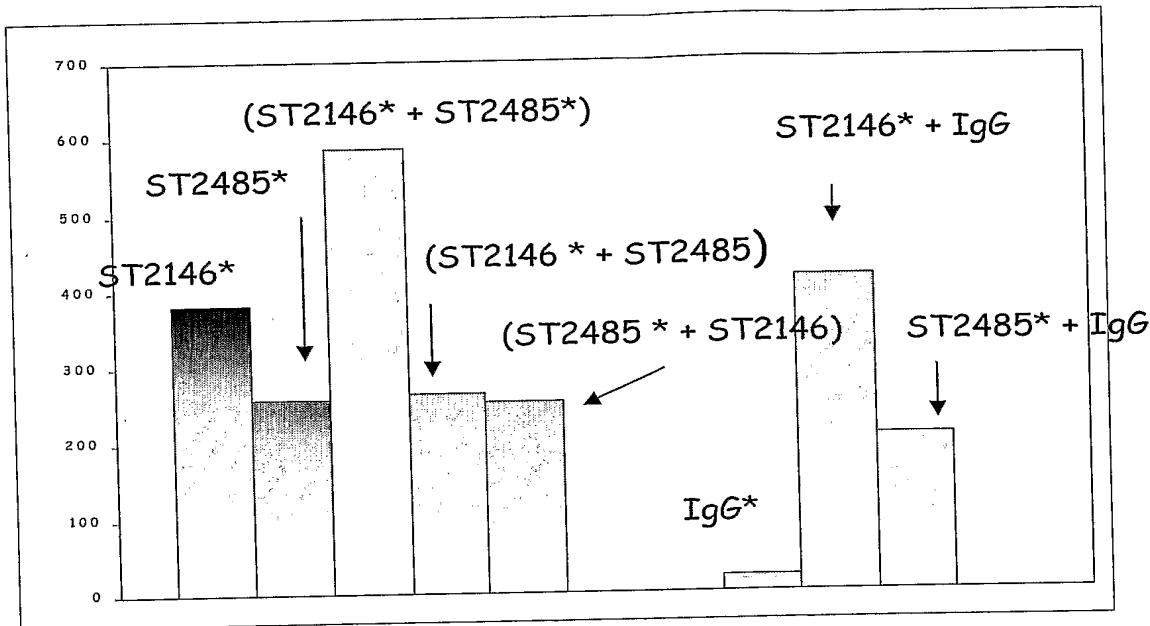
p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.



Merco

Figura 16

Additività degli anticorpi ST2485 e ST2146 nel modello animale;
localizzazione nella sede tumorale.



p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.

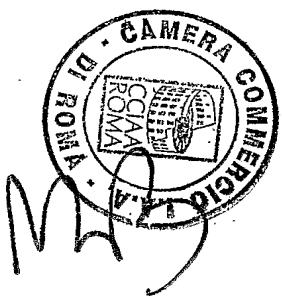


Figura 17

Sequenza SEQID 1 della regione variabile della catena leggera kappa (VL) di ST2485.

Peptide segnale

ATGGATTTCAGTGCAGATTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAA
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly Gln

TTGTTCTCTCCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGAGAAGGTACAAATGACTTG
Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

CDR1 ↓ N-oligosilaz
AGGGCCAACCTCAAGTGTACGTTCATGCAGTGGTACCGAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC
Arg Ala Asn Ser Ser Val Arg Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys

CDR2
CTGGATTTCAGTGCAGATTTCAGCTTCCTGCTCAGTGGCAGTGGCAGTGGTCTGG
Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

CDR3
GACCTCTTATTCTGTCAACATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGC
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Val Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

~~ATGGATTTCAGTGCAGATTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAA~~
Gln Trp Ser Ser Asn Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg Ala

p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.

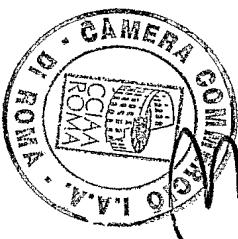



Figura 18

Sequenza SEQID 2 della regione variabile della catena pesante
gamma (VH) di ST2485

RM 2004 A 000105

Peptide segnale

ATGGGATGGAGCTGGATCTTCTCTCCTGTCAGGACTGCAGGTGTCCACTCTGAGGTCCAGCTG
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu

CAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCTGGAGCTCAATGAAGATTCTGCAAGGCTCTGG
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser

CDR1

TTACTCATTCACTGGTACACCATGA~~TTGGTACACCATGA~~ACTGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAATGGA
Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp

CDR2

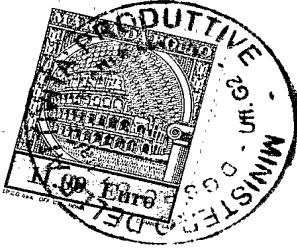
TTGGACTTAAATCCCTACAAATGGTGGFACTACCTACAACCAGA~~AACTACAACCAGA~~AGGGCAAGGCCACA
Ile Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr

TTAACTGTAGACAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTC
Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp

CDR3

TGCAGTCTATTACTGTACAAG~~ACCCCCGGGGGT~~ACTACTGGTCTCTGATGTCTGGGGCGCAGGG
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Gly Gly Tyr Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly

CCACGGTCACCGTCTCCTCA
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser



p.i. di TECNOGEN S.c.p.A.

Alessandro



N. 23